

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs durch BH3-only Proteine und Bcl-2 Inhibitoren

zur Erlangung des Akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Diplom-Biologin Nina Gebhardt
geboren am 23.05.1981 in Berlin

Dekan: Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Harald Saumweber
2. Prof. Dr. med. Peter Daniel
3. PD Dr. rer. nat. Ingeborg Tinhofer

eingereicht: 27.07.2009

Datum der Promotion: 13.11.2009

Abstract

In Tumoren führt die genetische bzw. epigenetische Deregulation von Proteinen der Bcl-2 Familie zur Apoptoseresistenz. Diese kann aus einem Verlust der pro-apoptotischen Multidomänenproteine Bax bzw. Bak oder einer Hochregulation von anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen wie Bcl-2, Bcl-x_L oder auch Mcl-1 heraus erfolgen. Die dritte Möglichkeit, Apoptoseresistenz zu entwickeln resultiert aus einer Inaktivierung von “BH3-only” Bcl-2-Homologen. Diese binden und sequestrieren anti-apoptotische Bcl-2 Proteine und induzieren hierdurch aktivierende Konformationsänderungen in Bax bzw. Bak. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Regulation von Apoptose durch pro-apoptotische Bcl-2-Proteine am Beispiel des bisher unzureichend untersuchten BH3-only-Proteins Noxa_S zu untersuchen. Zusätzlich sollte der Mechanismus der Apoptose-induktion durch niedermolekulare funktionelle Mimetika von BH3-only Proteinen in Tumorzellen untersucht werden. Hier wird gezeigt, dass die putativen BH3-Mimetika Gossypol, HA14-1 und zum Teil BH3I-2' unabhängig von Bax und Bak Zelltod induzierten. Dies weist darauf hin, dass die Apoptoseinduktion durch diese niedermolekularen Substanzen zumindest teilweise “off-target” ist, d.h. unabhängig von den Zielstrukturen der Bcl-2 Familie erfolgt. Eine andere Strategie zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs ist die Expression von BH3-only Proteinen. Das humane Gen *noxa* ist auf Chromosom 18q21 lokalisiert und kodiert für das BH3-only Protein Noxa, welches über eine strukturierte, α -helikale BH3- und eine Transmembrandomäne verfügt. Die Expression putativer Spleißvarianten des Noxa-Gens wurde auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Hierbei wurde das bekannte BH3-only Protein Noxa als kurze Spleißvariante (Noxa_S) und eine bisher unbekannte, lange Spleißvariante (Noxa_L) gefunden. Zur funktionellen Analyse und effizienten ektopen Expression wurden konditionale adenovirale Expressionsvektoren für beide Noxa-Varianten hergestellt. Die Überexpression von Noxa_S führte zu einer differenziellen Aktivierung von Bak und/oder Bax. Der wesentliche Effektor der Noxa_S-induzierten Apoptose in verschiedenen humanen Tumorzellen war jedoch Bak. Noxa_L hingegen verfügt über keine BH3-Domäne, induzierte aber dennoch Apoptose in einem Prostatakarzinom-Zelllinienmodell. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass es hier zu einer BH3-unabhängigen Aktivierung eines Bak-vermittelten Zelltod-Signalwegs kommt. Die vorliegende Arbeit liefert somit neue Erkenntnisse zur Zelltodregulation und experimentellen Apoptoseinduktion über BH3-unabhängige Signalmechanismen.

Abstract

In many tumors genetic and epigenetic deregulation of Bcl-2 family proteins lead to apoptosis resistance. This deregulation can occur through the loss of pro-apoptotic multidomain proteins Bax respectively Bak or through upregulation of anti-apoptotic Bcl-2 proteins like Bcl-2, Bcl-x_L or Mcl-1. The third alternative, to develop apoptosis resistance results from the inactivation of BH3-only Bcl-2 homologs. They bind and sequester anti-apoptotic Bcl-2 proteins and induce hereby activating conformational change in Bax and Bak. Therefore aim of the present work was to study the regulation of apoptosis by pro-apoptotic Bcl-2 proteins using the example of the inadequate explored BH3-only protein Noxa. In addition the mechanism of apoptosis induction in different tumor cells by small molecular substances mimicking the function of BH3-only proteins ought to be investigated. Here we show that the putative BH3-mimetics Gossypol, HA14-1 and partly BH3I-2' induce cell death independent from Bax and Bak. This shows that the induction of apoptosis by these substances is at least partly off target, i.e. occurs independent of the target structures of the Bcl-2 family. Another strategy to activate the mitochondrial signaling pathway is the expression of BH3-only proteins. The human gene *noxa* is located on chromosome 18q21 and encodes the BH3-only protein Noxa_S which possess an α -helical BH3 and a transmembrane domain. The expression of putative splicing variants of the *noxa* gene was carried out on mRNA and protein level. Here the known Noxa_S as short splicing variant (Noxa_S) and an up to that point unknown long splicing variant (Noxa_L) have been found. For functional analysis and efficient ectopic expression of the two splicing variants conditional adenoviral expression vectors have been generated. The overexpression of Noxa_S led to a differential activation of Bax and/or Bak. Though the main effector of Noxa_S -induced apoptosis in different human tumor cells was Bak. However Noxa_L does not contain a BH3 domain but still induced apoptosis in a prostate carcinoma cell system. Advanced studies showed a BH3 independent activation of a Bak mediated cell death signaling pathway. The present work therefore provides new insights into cell death regulation and experimental apoptosis induction via BH3 independent signaling mechanisms.

ABSTRACT	2
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	1
1.1 TUMORENTSTEHUNG	1
1.2 ZELLTOD	2
1.2.1 Apoptose	3
1.2.1.1 Extrinsischer Signalweg	4
1.2.1.2 Intrinsischer Apoptosesignalweg	5
1.2.1.3 Verbindung der Signalwege	6
1.3 CASPASEN	6
1.4 PROTEINE DER BCL-2 FAMILIE	7
1.4.1 Modelle zur Aktivierung von Bax und Bak	8
1.4.2 Redundanz von Bax und Bak	10
1.4.3 Aktivierung/Regulierung von BH3-only Proteinen	11
1.4.3.1 Das BH3-only Protein Noxa _S	11
1.5 THERAPEUTISCHE STRATEGIEN	13
1.5.1 Bcl-2 Inhibitoren	15
2 ZIELSETZUNG	17
3 MATERIAL	18
3.1 ZELLINIEN	18
3.2 ADENOVIREN ALS GENTRANSFERVEKTOREN	18
3.3 VEKTOREN	18
3.4 ZELLKULTURMEDIENTEN	19
3.5 CHEMIKALIEN	19
3.6 ENZYME, PROTEINE, MARKER UND PEPTIDE	21
3.7 PRIMER UND PRIMERSEQUENZEN	22
3.8 ANTIKÖRPER	23
3.9 KITS	24
3.10 MEMBRANEN	24
3.11 BAKTERIENSTÄMME	24
4 METHODEN	25
4.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
4.1.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien	25
4.1.2 Klonierungen	25
4.1.3 Transformation von Bakterien	26
4.1.3.1 Hitzeschocktransformation	26
4.1.3.2 Elektroporation	26
4.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien	26
4.1.4.1 Minipräparation	26

4.1.4.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	26
4.1.4.3	DNA-Präzipitation	26
4.1.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	27
4.1.6	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	27
4.1.7	Isolierung von Gesamt-RNA	27
4.1.8	Herstellung von cDNA durch RT-PCR	28
4.1.9	Real-time PCR (Taqman-Prinzip)	28
4.1.10	Klonierung von pcDNA3.1-Noxa _S und pcDNA3.1-Noxa _L	29
4.1.11	Konstruktion von Adenoviren	29
4.1.11.1	Klonierung des Plasmids pAd-Del.1.3+tTA	30
4.1.11.2	Klonierung der Shuttleplasmide.....	30
4.1.11.3	Homologe Rekombination und Amplifikation der adenoviralen Plasmide	31
4.1.12	Transfektion von HEK293 Zellen zur Produktion der rekombinanten Adenoviren.....	31
4.1.13	Adenovirusamplifikation	32
4.1.14	Virusreinigung über Cäsiumchlorid-Gradienten	32
4.1.15	Säulenreinigung.....	33
4.1.16	Test auf replikationskompetente Viren mittels PCR.....	33
4.1.17	Bestimmung der „Plaque-Forming Units“ (pfu/μl) durch Titration	34
4.1.18	Klonierung von Noxa _S bzw. Noxa _L -Fragmenten in den pGemT-Vektor	34
4.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	35
4.2.1	Kultivierung von stabilen Transfektanten.....	35
4.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	35
4.2.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	35
4.2.4	Behandlung von Zellen mit Zytostatika, BH3-Mimetika oder Proteasominhibitoren.....	36
4.2.5	Gentransfer in eukaryotische Zellen	36
4.2.5.1	Calcium-Phosphat-Transfektion	36
4.2.5.2	Lipofektion	36
4.2.6	Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren.....	36
4.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	37
4.3.1	Apoptosemessung	37
4.3.2	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (JC-1 Assay)	38
4.3.3	Messung der Caspaseaktivität	38
4.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	39
4.4.1	Proteinpräparation.....	39
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Pierce	39
4.4.3	Westernblotanalyse	39
4.4.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.4.3.2	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	41
4.4.3.3	Immunodetektion transferierter Proteine.....	41
4.5	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	42
5	ERGEBNISSE	43
5.1	BH3-MIMETIKA INDUZIEREN ZELLTOD IN KREBSZELLEN	43

5.1.1	Charakterisierung der Zellsysteme	43
5.1.2	BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig vom Bcl-2- und Bcl-x _L -Expressionsstatus	44
5.1.3	BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig von Bax und Bak	47
5.1.3.1	BH3-Mimetika induzieren den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials	48
5.1.3.2	Caspasen werden durch BH3-Mimetika aktiviert	49
5.2	VERSCHIEDENE SPLEIßVARIANTEN DES NOXA-GENS	50
5.2.1	PMA reguliert Noxa _S und Noxa _L	51
5.2.2	Proteasominhibitoren induzieren Noxa _S und Noxa _L	53
5.3	HERSTELLUNG DER REKOMBINANTEN ADENOVIREN ADNOXA _S UND ADNOXA _L	55
5.3.1	Klonierung der Transferplasmide	55
5.3.1.1	pcDNA3.1-Noxa _S , pcDNA3.1-Noxa _L	55
5.3.1.2	pAd2-MycNoxa _S , pAd2-MycNoxa _L	56
5.3.2	Herstellung der adenoviralen Plasmide und Generierung der Adenoviren	57
5.3.3	Regulierbare Expression von Noxa _S und Noxa _L	57
5.4	DAS BH3-ONLY PROTEIN NOXA _S INDUZIERT APOPTOSE IN ZERVIXKARZINOMZELLEN	58
5.5	NOXA-SPLEIßVARIANTEN INDUZIEREN APOPTOSE IN PROSTATAKARZINOMZELLINIEN	61
5.5.1	Pancaspaseinhibitor Q-VD-OPh hemmt die Noxa _S - bzw. Noxa _L -induzierte Apoptose	62
5.5.2	Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Noxa _S - bzw. Noxa _L -Expression	63
5.5.3	Noxa _S und Noxa _L induzieren die Aktivierung von Bax und Bak	64
5.6	NOXA _S INDUZIERT ZELLTOD UNABHÄNGIG VON BAX UND BAK IN KOLONKARZINOMZELLINIEN	67
5.6.1	Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nach Noxa _S -Expression	68
5.6.2	Noxa _S induziert die Aktivierung von Caspasen	69
5.6.3	Ein Pancaspaseinhibitor hemmt die Noxa _S -induzierte Apoptose	70
5.6.4	Regulation von Bcl-2 Familienmitgliedern nach Expression von Noxa	71
5.7	LOKALISATION VON NOXA _L	72
6	DISKUSSION	74
6.1	INDUKTION VON ZELLTOD DURCH BCL-2 INHIBITOREN	74
6.1.1	BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig vom Bcl-2- bzw. Bcl-x _L -Expressionsstatus	75
6.1.2	„off-target“-Effekte putativer Bcl-2 Inhibitoren	77
6.2	VERSCHIEDENE SPLEIßVARIANTEN DES NOXA-GENS	79
6.3	DAS BH3-ONLY PROTEIN NOXA _S INDUZIERT APOPTOSE IN ZERVIXKARZINOMZELLEN	80
6.3.1	Regulation der Bcl-2 Familienmitglieder nach Expression von Noxa	82
6.4	NOXA _S INDUZIERT APOPTOSE IN PROSTATAKARZINOMZELLEN	82
6.5	NOXA _S INDUZIERT ZELLTOD UNABHÄNGIG VON BAX UND BAK	84
6.5.1	Regulation der Bcl-2 Familienmitglieder	87
6.6	NOXA _L INDUZIERT APOPTOSE IN PROSTATAKARZINOMZELLEN	87
6.7	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON NOXA _L	89
7	ZUSAMMENFASSUNG	91
	LITERATURVERZEICHNIS	93
	ANHANG	116

SEQUENZEN VON NOXA _S , NOXA _L UND NOXA _{L2}	116
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
DANKSAGUNG	124
ERKLÄRUNG	125
POSTER	126
VORTRÄGE	126
PUBLIKATIONEN.....	126

1 Einleitung

1.1 Tumorentstehung

In normalen adulten Geweben besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch regulierten Zelltod. Beide Phänomene werden durch komplizierte Regulationssysteme engmaschig kontrolliert [Daniel, 2000; Krammer et al., 1994]. Dies spiegelt sich auch in der Bedeutung dieser beiden zellbiologischen Phänomene bei der Entstehung von benignen und malignen Tumoren wider. Die ungehemmte Aktivierung von Zellzyklus-aktivierenden Signalwegen begünstigt die Tumorentstehung, ebenso wie die Inaktivierung von Zelltodsignalwegen [Wyllie et al., 1999]. Die Aktivierung von Proliferationssignalen durch Onkogene führt obligat zu gleichzeitiger Aktivierung von Apoptosesignalen, was einem Verlust der Wachstumskontrolle bei alleiniger, zufälliger Aktivierung eines Onkogens entgegen wirkt und somit einen wichtigen tumorprotektiven Kontrollmechanismus darstellt. Erst durch die zusätzliche Störung zelltodfördernder Signalwege wird die Tumorentstehung begünstigt [Vaux et al., 1988]. Dies kann durch Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 [Eischen et al., 1999], durch Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen z.B. Bcl-2 [Fanidi et al., 1992; Strasser et al., 1990] oder Verlust von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax [Eischen et al., 2001] erfolgen. Auch die Inaktivierung von BH3-only Proteinen scheint an der malignen Transformation von Tumorzellen beteiligt zu sein [Egle et al., 2004; Sturm et al., 2006]. Ebenso kann die Deregulation von Transkriptionsfaktoren, vor allem von NF- κ B, Onkogen-induzierte Apoptosesignale hemmen [Dutta et al., 2006]. Im Fall von NF- κ B erfolgt dies durch Induktion von NF- κ B Zielgenen wie Bcl-2, Bcl-x_L, Bfl-1 und cIAP2. Die Hochregulation der Genexpression anti-apoptotischer Gene kann auch durch chromosomale Translokationen erfolgen. Dabei handelt es sich um einen Mechanismus der vor allem in malignen Lymphomen beobachtet wird. Zum Beispiel bringt die in follikulären Lymphomen gefundene t(14;18)-Translokation das Bcl-2 Gen unter die Kontrolle des Immunglobulin-Schwerketten-Gen-Enhancers [Tsujimoto und Croce, 1986; Tsujimoto et al., 1984] und führt zu dereguliert hoher Bcl-2-Expression, welche mit ausgeprägter Apoptose- und Therapieresistenz dieses Lymphomtyps einhergeht.

Alle malignen Tumore weisen Störungen der Proliferations- und der Zelltodkontrolle auf. Sie sind zudem häufig genetisch instabil und akkumulieren nach den initialen transformierenden genetischen Ereignissen weitere sekundäre Veränderungen [Hoeijmakers, 2001]. Loeb et al. sprechen von einem „Mutatorphänotyp“, was bedeutet, dass ein Tumor von 10⁸ Zellen eine 10⁹ verschiedener Mutationen trägt [Loeb et al., 2003]. Allerdings gibt es Schätzungen, dass nur fünf bis zehn kausale Mutationen für die Entstehung eines soliden Tumors nötig sind und es sich bei dem Rest um epiphänomenale Veränderungen handelt [Hanahan und Weinberg, 2000; Pelengaris et al., 2002; Renan, 1993]. Diese Veränderungen können zu einem weiteren Verlust der Proliferationskontrolle und noch stärkerer Apoptoseresistenz führen. Solche Veränderungen werden zum Teil im Rahmen der Tumorprogression beobachtet, d.h. bei der Entstehung aggressiverer und Therapie-resistenter Tumoren, z.B. als Folge einer Selektion im Rahmen von Chemo- oder Strahlentherapie.

Tierexperimentelle Daten geben Hinweise auf das Phänomen der „Onkogensucht“ („oncogene addiction“) von Tumorzellen, d. h., dass Tumore *in vivo*, initiiert durch ein einzelnes Onkogen, von diesem abhängig bleiben und über Apoptose sterben, wenn das initiale Onkogen unterdrückt wird [Hickman, 2002]. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der Kinasehemmer Imatinib, der bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML)

eingesetzt wird. Durch die Hemmung der Abl-Kinase und der hieraus resultierenden Hemmung des Onkogensignals, des Bcr-Abl-Fusionsgen-Produkts, werden Wachstums hemmung und apoptotischer Zelltod in Tumorzellen ausgelöst [le Coutre et al., 1999].

Die Induktion von Zelltod wird durch verschiedene Signalwege kontrolliert, die in unterschiedlichen Veränderungen resultieren. Diese morphologischen und biochemischen Charakteristika wurden zur Unterteilung in verschiedene Zelltodformen herangezogen.

1.2 Zelltod

Der regulierte Zelltod spielt als programmierter Zelltod eine zentrale Rolle in der Entwicklungsbiologie und bei der Reaktion von Zellen auf verschiedenste Stressstimuli. Morphologisch und biochemisch können im Wesentlichen vier Zelltodformen unterschieden werden: Apoptose, Autophagie, mitotische Katastrophe und Nekrose [Clarke und Clarke, 1996].

Apoptose (griech. „apo“ für „weg“ und „ptosis“ für „Fall“) wurde 1972 von den Pathologen Kerr, Wyllie und Currie als eigenständiges und bedeutendes zellbiologisches Phänomen definiert [Kerr et al., 1972]. Kernschrumpfung, Kondensation des Chromatins im Zellkern, Fragmentierung des Zellkerns und Ausstülpung von Zellmembranblasen infolge der Zerstörung des Zytoskeletts bei gleichzeitig erhaltener Integrität der Plasmamembran sind klassische Merkmale der Apoptose. Durch Abschnürung von ausgestülpten Membrananteilen kommt es zur Bildung apoptotischer Körperchen, die durch Phagozytose von professionellen Phagozyten aufgenommen und somit ohne Entzündungsreaktion aus dem Gewebsverbund entfernt werden.

Die bereits von Rudolf Virchow beschriebene Nekrose (griech. „nekros“ für „Tod“) ist die schwerste Form der Zell- bzw. Gewebszerstörung. Im Gegensatz zur Apoptose, welche ein aktiv regulierter und energieabhängiger Prozess ist, handelt es sich bei der Nekrose um ein passives Ereignis, welches durch thermische, chemische oder mechanische Schädigung der Zelle ausgelöst werden kann. Nekrotische Zellen zeichnen sich durch das Anschwellen von Organellen und Zellkern (ohne Chromatinkondensation) und einen sehr frühen Verlust der Plasmamembranintegrität aus. Dabei führt der Austritt von Zellinhalten in den Extrazellulärraum im umliegenden Gewebe zur Entzündungsreaktion.

Autophagie ist eine Stress- und Anpassungsreaktion der Zelle auf Wachstumsfaktor-, Substrat- oder Energiemangel. Es kommt typischerweise zur Aufnahme von Zellbestandteilen, insbesondere auch Organellen, in Lysosomen, die dann als Autophagosomen in der Zelle nachweisbar sind [Klionsky et al., 2008]. Durch den lysosomalen Abbau gelingt es der Zelle den Energiehaushalt aufrechtzuerhalten und somit vorübergehende Mangelsituationen zu überwinden. Hält der Mangel an, wird der Energiehaushalt so lange aufrechterhalten bis erste Zellfunktionen aufgrund der zellulären Atrophie versagen und die Zelle zugrunde geht [Galluzzi et al., 2008].

Die vierte bekannte Form des Zelltods, die mitotische Katastrophe ist ein archaischer Mechanismus, der in proliferierenden Zellen infolge von Fehlern der mitotischen Zellteilung z.B. Defekten im mitotischen Spindelapparat und aberranter Verteilung von Chromosomen auf die Tochterzellen, ausgelöst werden kann. Morphologisch geht sie mit einer Vergrößerung des Zellkerns und, aufgrund des Ausbleibens der Anaphase, mit der Entwicklung einer Polyploidie einher [Castedo et al., 2004]. Es kann, durch asymmetrische Mitosen zur

Bildung von Mikronuklei kommen. Die Einteilung in die genannten Zelltodformen wird durch das Auftreten von Mischformen erschwert.

1.2.1 Apoptose

Apoptose ist ein physiologischer Prozess zur selektiven Eliminierung von Zellen in der Embryonalentwicklung sowie in der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben. Störungen der Apoptoseregulation können in verschiedenen Erkrankungen resultieren. Wird der Prozess inhibiert, können Krebserkrankungen entstehen, wobei der Prozess der Apoptose sowohl mit Tumorgenese als auch mit Therapieresistenz und der Bildung von Metastasen assoziiert ist. Bei einer Vielzahl degenerativer Erkrankungen, wie der Creutzfeldt-Jakob-Enzephalopathie, der Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit findet man erhöhte Apoptoseraten. Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt zu einer gestörten Neuronenfunktion und zur Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalwegs [Bredesen et al., 2006].

Bedeutende Erkenntnisse über die Apoptoseregulation wurden in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* gewonnen und zeigen, dass hier ein evolutionär konserviertes Prinzip vorliegt [Hengartner, 1999]. Die Regulation der Apoptose in Säugetieren erfolgt über distinkte Signale und Signalwege. Wesentlich für die Apoptose ist die Aktivierung von Effektorcaspasen (Abb. 1). Im Gegensatz hierzu sind die anderen Zelltodformen Nekrose, Autophagie und mitotische Katastrophe Caspase-unabhängige Prozesse [Okada und Mak, 2004]. Die verschiedenen apoptotischen Signalwege haben die Ausbildung eines zytosolischen, todes-induzierenden Signaltransduktionskomplexes, zum einen des DISCs (Death-induced signaling complex) zum anderen des Apoptosoms, sowie die darauf folgende kaskadenartige Aktivierung einander nachgeschalteter Apoptose-fördernder Faktoren, welche die Aktivierung von Caspasen vermitteln, gemein [Kischkel et al., 1995; Krammer, 2000; Li et al., 1997]. Rekrutierte Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) aktivieren in der Signalkaskade nachgeschaltete Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die dann die irreversible Zerstörung der Zelle auslösen [Nunez et al., 1998]. Konzeptionell können zwei wesentliche Apoptosesignalwege unterschieden werden: der extrinsische und der intrinsische. Der extrinsische Apoptoseweg dient der Erkennung regulierter Apoptosesignale aus der Zellumgebung, wodurch gezielt unerwünschte Zellen aus dem Gewebsverband entfernt werden können. Der intrinsische Apoptosesignalweg wird hingegen über intrazellulär erzeugte Signale wie DNA-Schädigung, ER-Stress (Endoplasmatisches Retikulum) oder nutritiven Stress eingeleitet und hauptsächlich durch pro- bzw. anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie kontrolliert [Daniel et al., 2003].

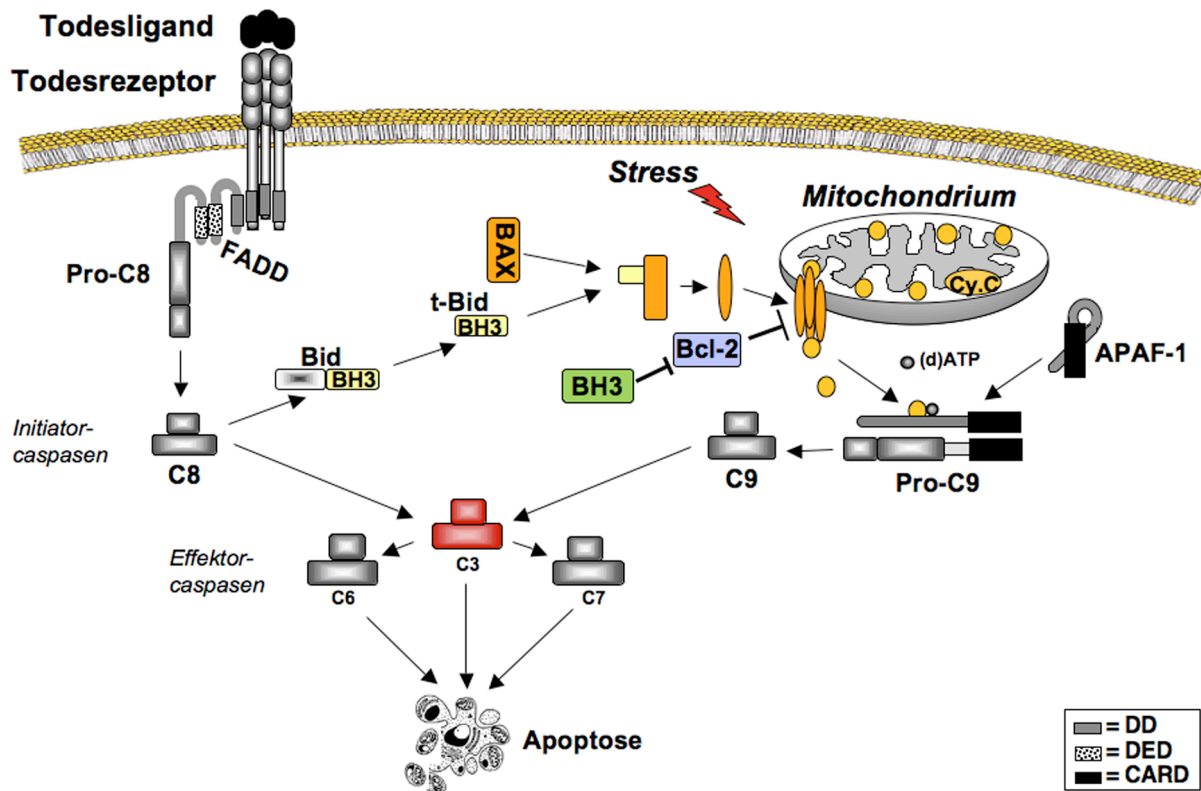


Abb. 1: Extrinsischer und intrinsischer Apoptosesignalweg

Der extrinsische Signalweg wird über Todesliganden, die an Todesrezeptoren binden, induziert. Die Aktivierung der Todesrezeptoren (enthalten Todesdomänen (death domain DD)) resultiert in der Bildung des DISC wodurch Procaspase-8 (Pro-C8, enthält eine Todeseffektordomäne (death effector domain DED)) aktiviert wird. Caspase-8 (C8) spaltet die Effektorcaspasen (C3, C7, C6), was zum Untergang der Zelle führt. Der intrinsische Signalweg wird über interne Stresssignale ausgelöst und resultiert in der Aktivierung der Mitochondrien, welche durch Bcl-2 Proteine kontrolliert wird. Die Aktivierung der Mitochondrien führt zur Freisetzung von Cytochrom c (Cy. c). Zytoplasmatisches Cytochrom c bindet an APAF-1 (enthält caspase activation and recruiting domain (CARD)). APAF-1 bindet als Energielieferanten dATP und kann in Folge einer Konformationsänderung Procaspase-9 (Pro-C9, enthält CARD) binden, wodurch über das Prinzip der induzierten Nähe Caspase-9 aktiviert wird. Caspase-9 spaltet proteolytisch die Effektorcaspasen (C3, C7, C6) und führt über die Proteolyse von strukturellen und regulatorischen Substratproteinen zum Zugrundegehen der Zelle. Die beiden Signalwege sind über das BH3-only Protein Bid miteinander verknüpft. Diese Verknüpfung ermöglicht die Amplifikation des Todessignals.

1.2.1.1 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird über Todesrezeptoren, eine Subfamilie der TNF-R-Superfamilie (tumor necrosis factor-receptor) mit sogenannter „death domain“ (Todesdomäne DD), welche in der Plasmamembran lokalisiert sind, vermittelt (Abb. 1). Trimere Todesliganden wie TNF oder TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) binden an diese Rezeptoren und vermitteln sowie stabilisieren dadurch die Trimerisierung der Rezeptoren. An die zytosolische Todesdomäne des Rezeptor-Oligomers werden Adaptermoleküle wie FADD (Fas associated death domain) rekrutiert. Die Adaptermoleküle können über ihre N-terminale DED-Domäne (death effector domain) simultan mit der DED-Domäne von Initiatorcaspasen interagieren. Dieser Proteinkomplex aus aggregiertem Rezeptor, Adaptermolekül und Initiatorcaspase wird auch als DISC bezeichnet [Boldin et al., 1995]. Durch das Prinzip der induzierten Nähe werden im DISC die Initiatorcaspasen-8 und -10 aktiviert. Es wird kontrovers diskutiert, ob zur Aktivierung der Initiatorcaspasen die proteolytische Spaltung in

p10- und p20-Untereinheiten, wie es bei Effektorcaspasen der Fall ist, erfolgen muss [Shi, 2004]. Nach Aktivierung der Initiatorcaspasen aktivieren diese Effektorcaspasen, welche zur Exekution der Zelle führen.

Die Bindung in den DISC und Aktivierung von Caspase-8/-10 kann durch FLIP-Proteine (FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory protein) gehemmt werden. FLIP kommt in Form von drei Spleißvarianten vor: die kurze Variante FLIP_S, die lange Spleißvariante FLIP_L und das kürzlich beschriebene FLIP_R [Budd et al., 2006]. FLIP_L ähnelt in seiner Peptidsequenz stark der Procaspase-8 und kann über seine DED-Domäne in den DISC binden und dadurch die Procaspase-8 kompetitiv verdrängen. Des Weiteren interagiert FLIP_L, wie auch FLIP_S, wahrscheinlich im Sinne einer homotypischen Interaktion, mit der Procaspase-8 und wird als Substrat mit langsamer Kinetik gespalten, wirkt also als klassischer Substratinhibitor der Caspase-8-Enzymaktivität.

1.2.1.2 Intrinsischer Apoptosesignalweg

Der intrinsische Signalweg, auch mitochondrialer Signalweg genannt, wird über interne Stresssignale, wie DNA-Schädigung oder Hypoxie initiiert. Die Regulation erfolgt über die Proteine der Bcl-2 Familie (siehe Kapitel 1.4). Anti-apoptotische Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-x_L oder Mcl-1 hemmen und kontrollieren die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs. Im Gegensatz dazu aktivieren pro-apoptotische Proteine wie Bax, Bak oder Bok direkt die Mitochondrien [Leber et al., 2007]. Diese Aktivierung der Mitochondrien kann in distinkte Schritte unterteilt werden [Daniel, 2008]:

1. Es kommt es zu einer N-terminalen (im Falle von Bax auch zu einer C-terminalen) Konformationsänderung in Bax bzw. Bak, welche deren Aktivierung zur Folge hat. Bak ist konstitutiv in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und wird dort aktiviert. Bax hingegen transloziert vom Zytosol in die äußere Mitochondrienmembran. Dort oligomerisieren Bax und Bak.
2. Die Oligomerisierung führt zur Öffnung von Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch pro-apoptotische Faktoren wie Cytochrom c, Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) und die Serinprotease Omi/HtrA2 aus dem Intermembranraum freigesetzt werden [Daniel et al., 2003].
3. Die Atmungskette als Energielieferant bleibt intakt.
4. Durch den Einstrom von zytosolischen Ionen und Wasser kommt es im weiteren Verlauf zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), gefolgt von der mitochondrialen Permeabilitätstransition mit Anschwellen der Mitochondrien und Platzen der äußeren und später auch der inneren Membran.
5. Es kommt letztendlich zum Zusammenbruch der Atmungskette.

Die Aktivierung der Mitochondrien und die daraus resultierende Freisetzung von Cytochrom c ins Zytosol führt zur Bildung des Signalkomplexes Apoptosom. Cytochrom c bindet im Zytosol an das Adapterprotein APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) das auch dATP bindet [Perkins et al., 1998]. Hierdurch wird eine Konformationsänderung in APAF-1 ausgelöst und APAF-1 kann über die CARD-Domäne (caspase activation and recruitment domain) die Procaspase-9-CARD-Domäne binden. Die im Apoptosom über das Prinzip der induzierten Nähe aktivierte Caspase-9 kann durch limitierte Proteolyse die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktivieren und hierdurch die Exekution der Apoptose einleiten [Hengartner, 2000]. Während der Apoptose wird, wie bereits erwähnt, auch Smac als mitochondrialer Caspaseaktivator freigesetzt [Du et al., 2000; Verhagen et

al., 2000]. Smac bindet an IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) und hemmt hierdurch die Bindung der IAPs an Caspase-9 und vor allem auch an Caspase-3, wodurch Caspaseaktivierung begünstigt wird [Ekert et al., 2001].

1.2.1.3 Verbindung der Signalwege

Der Todesrezeptor-vermittelte Apoptosesignalweg und der mitochondriale Signalweg konvergieren auf der Ebene der Caspase-3-Aktivierung (Abb. 1). Die Caspase-3 Aktivität kann durch IAP-Proteine gehemmt werden, die wiederum durch die Freisetzung von Smac aus den Mitochondrien antagonisiert werden können. Eine weitere Verbindung zwischen Todesrezeptor-vermittelter Apoptose und dem mitochondrialen Signalweg vermittelt Bid [Wang et al., 1996]. Bid kann über einen Caspase-8-abhängigen Mechanismus zu tBid (trunkiertem Bid) gespalten werden. Neben Caspase-8 und -3 können auch andere Proteasen Bid spalten, wie z.B. Granzym B. Je nach Spaltstelle kann tBid möglicherweise entweder mit Bax (Granzym B-Spaltung) oder mit Bak (Caspase-8-Spaltung) interagieren und hierdurch den intrinsischen Zelltod-Signalweg aktivieren [Cartron et al., 2003]. tBid wird im Modell der direkten Aktivierung als Aktivator bezeichnet, das es Bak und Bax direkt aktivieren kann. Im Gegensatz dazu geht das Modell der indirekten Aktivierung davon aus, dass tBid an alle anti-apoptotischen Familienmitglieder bindet und somit Bax und Bak indirekt aktiviert (siehe Kapitel 1.4.1). Die Bindung von tBid an Bax oder Bak bzw. das Freisetzen von Bax und Bak aus der Bindung mit anti-apoptotischen Proteinen durch tBid führt zu einer Konformationsänderung welche die Oligomerisierung dieser Proteine zur Folge hat und zur Aktivierung der Mitochondrien führt. Mit der Aktivierung der Mitochondrien ist auch der intrinsische Signalweg aktiviert, deshalb spricht man von einem positiven Rückkopplungsmechanismus, der die Apoptosesignalkaskade amplifiziert [Crompton, 2000]. Man unterscheidet zwei Gruppen von Zellen: Typ-I Zellen sind nicht in der Lage den Rückkopplungsmechanismus zu aktivieren, wohingegen Typ-II Zellen die Aktivierung von Bax und Bak durch tBid induzieren können [Scaffidi et al., 1998].

1.3 Caspasen

Phylogenetisch werden die Caspasen in zwei Untergruppen eingeteilt. Die ICE-Untergruppe (interleukin-1 β -converting enzyme) spielt vorwiegend bei Entzündungsreaktionen eine Rolle. Dazu zählen die Caspasen-1, -4, -5 und -13. Die ced-3 Untergruppe mit den Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 ist nochmals in Apoptose-Effektoren (Caspasen-3, -6, -7) und Apoptose-Initiatoren (Caspasen-2, -8, -9, -10) unterteilt [Nicholson, 1999]. Der Name Cysteinylasspartase oder kurz Caspase leitet sich daraus ab, dass das aktive Zentrum ein Cystein trägt und C-terminal von einem Aspartat im Substratprotein spaltet [Shi, 2004]. Caspasen werden als Zymogene, d.h. als inaktive Vorstufen des aktiven Enzyms synthetisiert und sind im Zytosol und Zellkern, jedoch nicht in den Mitochondrien oder Lysosomen lokalisiert. Die inaktiven Zymogene, auch als Procaspasen bezeichnet, bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, der in der Peptidsequenz eine große (p20) und eine kleine (p10) Untereinheit folgen. Diese sind über kurze Linkerpeptide miteinander verbunden [Zimmermann et al., 2001]. Das katalytische Zentrum ist in der großen Untereinheit (p20) lokalisiert [Li und Yuan, 2008]. Die Caspasen-2, -8, -9 und -10 sind Caspasen mit langer Prodomäne und agieren als so genannte Initiatorcaspasen, da sie die Caspasekaskade einleiten. Adaptermoleküle wie FADD oder APAF-1 binden an regulatorische Domänen (DED bzw. CARD) der Prodomänen der Initiatorcaspasen, die für die Aktivierung erforderlich sind. Effektorcaspasen wie Caspase-3, -6 und -7 tragen kurze Prodomänen, da ihre Aktivierung nicht in Signalkomplexen erfolgt, sondern durch

proteolytische Spaltung funktionell übergeordneter Initiatorcaspasen. Die enzymatisch aktiven Caspasen stellen Heterotetramere aus jeweils zwei p10- und zwei p20-Untereinheiten dar und leiten die Endphase der Apoptose ein. Sie attackieren und spalten eine Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine und machen den Vorgang somit unumkehrbar [Fischer et al., 2006]. ICAD (Inhibitor der Caspase aktivierten DNase (CAD)) z.B. ist ein Substrat der Caspase-3 und wird im Zuge der Apoptose gespalten, dadurch wird CAD aktiviert [Enari et al., 1998]. CAD spaltet die genomische DNA an exponierten Stellen des Chromatins, entsprechend den 180bp-Wicklungen um Histonproteine, wodurch die für die Apoptose charakteristische oligonukleosomale DNA-Fragmentierung entsteht. PARP ist ein ATP verbrauchendes DNA-Reparaturenzym und Substrat der Caspase-3, infolge der proteolytischen PARP Spaltung wird die DNA-Reparatur und ATP-Depletion während der Apoptose gehemmt. Die zufällige Aktivierung von Caspasen wird durch IAPs wie XIAP und cIAP verhindert.

1.4 Proteine der Bcl-2 Familie

Die Proteine der Bcl-2 Familie kontrollieren als zentrale Apoptoseregulatoren die Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien und somit indirekt die daraus resultierende Caspaseaktivierung [Cory et al., 2003; Reed, 1998]. Die Fähigkeit der Bcl-2 Familienmitglieder zur gegenseitigen Bindung führte zum sogenannten Rheostat-Modell: das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern innerhalb der Zelle bestimmt, ob diese überlebt oder stirbt [Korsmeyer et al., 1993]. Die feine Balance wird auf transkriptioneller oder posttranslatiionaler Ebene als Antwort auf verschiedene zelluläre Signale reguliert [Wong und Puthalakath, 2008]. Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) wurde als erstes Mitglied dieser Apoptose-regulierenden Genfamilie beim Menschen identifiziert. Es wurde in follikulären Lymphomen entdeckt, bei denen die Expression des Bcl-2 Gens durch eine Translokation unter die Kontrolle des IgH-Enhancers gebracht wurde [Tsujimoto et al., 1984]. Mittlerweile sind circa 20 Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie bekannt, die in drei Gruppen eingeteilt werden (Abb. 2A). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Zur Gruppe der anti-apoptotischen Bcl-2-homologen Proteine gehören neben Bcl-2, die Proteine Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-w und Bfl-1. Demgegenüber stehen die Mitglieder der pro-apoptotischen Proteine. Diese werden nochmals in die Untergruppe der Bax-Homologen Proteine Bax, Bak und Bok und die Untergruppe der BH3-only Proteine unterteilt. Zu der wachsenden Gruppe der BH3-only Proteine gehören unter anderem Bad, Bim, Noxa (im Folgenden Noxa_s genannt), Puma, Bid, Nbk, Bmf, BNIP3, Spike, Beclin1, Bcl-G, Rambo, Bcl-B und Hrk [Daniel et al., 2003; Fletcher und Huang, 2006].

In der Bcl-2 Familie findet man vier verschiedene evolutionär konservierte Domänen, die als Bcl-2-Homologie-Domänen 1 bis 4 (BH1 bis 4) bezeichnet werden. Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie sind mit Ausnahme von Mcl-1, welches nur über die BH-Domänen 1 bis 3 verfügt, durch das Vorhandensein von allen vier BH-Domänen charakterisiert (Abb. 2A). Die pro-apoptotischen Multidomänenproteine Bax, Bak und Bok besitzen die Domänen BH1 bis 3 und sind der Bcl-2 Subfamilie strukturell sehr ähnlich. In der Gruppe der BH3-only Proteine findet man lediglich die BH3-Domäne. BH-Domänen vermitteln die Proteininteraktionen zwischen den Familienmitgliedern (Abb. 2B). Dabei formen die BH-Domänen 1 bis 3 eine hydrophobe Furche, in welche die hydrophobe Oberfläche der amphipatischen α -Helix (ca. 24 Aminosäurereste) einer anderen BH3-Domäne (meist Bax, Bak, BH3-only Proteine) binden kann [Youle und Strasser, 2008].

Die meisten anti-apoptotischen Proteine besitzen eine C-terminale Transmembrandomäne und sind hauptsächlich an der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch an der Kernhülle und dem ER lokalisiert. Pro-apoptotische Familienmitglieder liegen zytosolisch (z.B. Bax) oder membranassoziiert (z.B. Bak) vor, wobei die Membranassoziation ebenfalls durch eine C-terminale Signalsequenz in der Transmembrandomäne vermittelt wird. Hierarchisch gesehen, stehen die BH3-only Proteine an oberster Stelle, da sie als Sensoren für Stress fungieren und Bax, Bak sowie Bok aktivieren können. Die pro-apoptotischen Multidomänenproteine Bax, Bak und Bok stehen hierarchisch an unterster Stelle. Sie werden von den anti-apoptotischen Proteinen sequestriert und die Apoptose somit gehemmt.

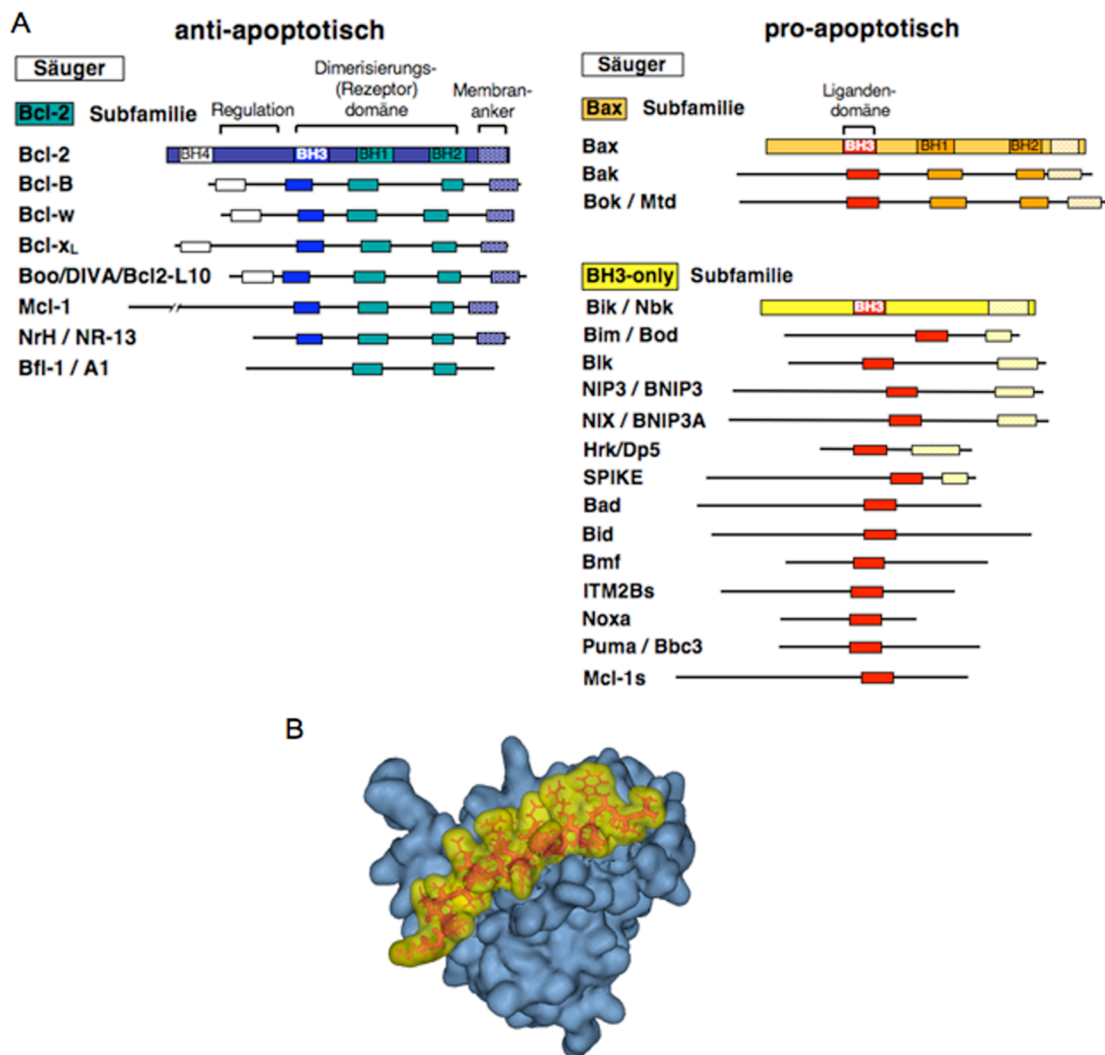


Abb. 2: Proteine der Bcl-2 Familie

A anti- und pro-apoptotische Gruppen

B schematische Darstellung einer Proteininteraktion: 3D-Modell von Bcl-x_L (blau) und Bak-BH3-Peptid (gelb; Stabmodell rot)

1.4.1 Modelle zur Aktivierung von Bax und Bak

Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse gilt es als sicher, dass BH3-only Proteine oberhalb von Bax und Bak wirken, da sie unabhängig von Bax und Bak keine Apoptose induzieren können [Cheng et al., 2001; Zong et al., 2001]. Die Aktivierung von Bax und Bak wird allerdings in zwei unterschiedlichen Modellen kontrovers diskutiert (Abb. 3).

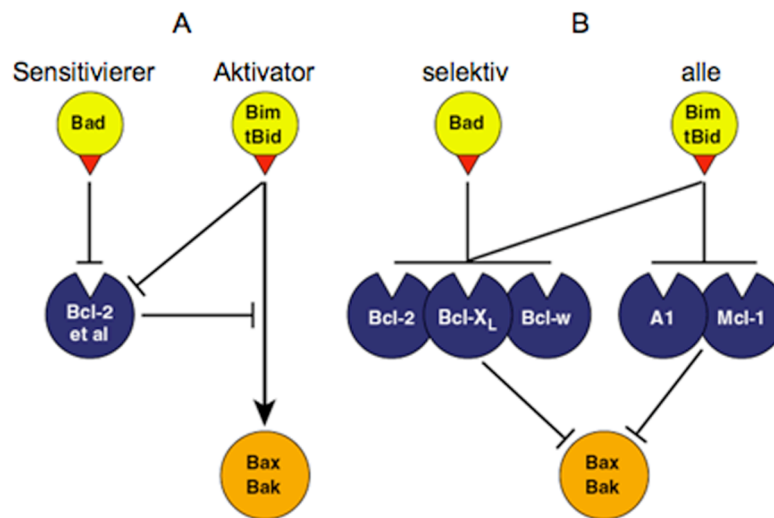


Abb. 3: Modelle zur Aktivierung von Bax und Bak [Adams und Cory, 2007]

A Modell der direkten Aktivierung

B Modell der indirekten Aktivierung

Das Modell der direkten Aktivierung beruht darauf, dass bestimmte BH3-only Proteine (tBid, Bim und Puma), auch als Aktivatoren bezeichnet, direkt an Bax und Bak binden und dadurch deren Aktivierung vorantreiben [Certo et al., 2006; Kim et al., 2006; Kuwana et al., 2005; Letai et al., 2002; Oh et al., 2006; Walensky et al., 2006] (Abb. 3A). Die anderen BH3-only Proteine, Sensitivierer genannt, binden an anti-apoptotische Familienmitglieder und wirken indem sie Bim und tBid aus der Bindung mit diesen verdrängen, wodurch diese Bax und Bak direkt aktivieren können. Da bisher keine direkten Interaktionen zwischen Bax und Bid bzw. Bim gezeigt werden konnten, spricht man auch vom „hit and run“ Modus. Das Modell der direkten Aktivierung widerspricht den Ergebnissen von Willis et al. [Willis et al., 2007], die gezeigt haben dass ein Knockout von Bim und Bid sowie ein gleichzeitiger Knockdown von Puma die Bad- und Noxa_S-induzierte Apoptose nicht unterbinden kann. Das von Willis et al. vorgeschlagene Modell der indirekten Aktivierung geht davon aus, dass alle BH3-only Proteine nur an anti-apoptotische Familienmitglieder binden und somit deren Bindung an Bax und Bak verhindern [Willis und Adams, 2005; Willis et al., 2007] (Abb. 4). Die anti-apoptotischen Proteine fungieren demnach hauptsächlich als Inhibitoren von Bax und Bak. Werden BH3-only Proteine aktiviert, verdrängen sie Bax und Bak aus ihrer Bindung mit anti-apoptotischen Proteinen wodurch Bax und Bak aktiviert werden. Dieses Modell erklärt aber nicht, wie die Konformationsänderung von Bax und Bak und somit deren Aktivierung realisiert wird. Das Modell der indirekten Aktivierung geht davon aus, dass BH3-only Proteine unterschiedliches apoptotisches Potential besitzen, wobei zusätzlich festgestellt wurde, dass nicht alle BH3-only Proteine gleiche Bindungsaffinitäten zu den anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern aufweisen (Abb. 4). Starkes apoptotisches Potential haben die BH3-only Proteine Bim, tBid und Puma, welche auch alle anti-apoptotischen Proteine binden, wohingegen die anderen BH3-only Proteine ein schwaches Apoptosepotential besitzen und nur mit einem Teil der anti-apoptotischen Proteine Bindungen eingehen. So bindet Noxa_S nur an die Proteine Mcl-1 und A1. Bad und Bmf hingegen binden nur an Bcl-2, Bcl-X_L oder Bcl-w [Chen et al., 2005] (Abb. 4). Die Kombination von zwei „schwachen Killern“ wie Noxa_S und Bad ist ausreichend, um alle potentiellen anti-apoptotischen Proteine zu binden und Apoptose zu induzieren [Chen et al., 2005; Willis et al., 2007].

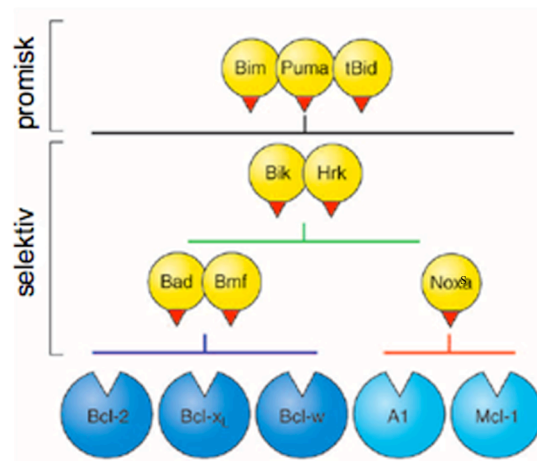


Abb. 4: Bindungseigenschaften und apoptotisches Potential der BH3-only Proteine [Willis und Adams, 2005]

Dargestellt sind BH3-only Proteine (gelb) mit ihren Bindungsaffinitäten zu anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern (blau) und den daraus resultierenden Potentialen (promisk, selektiv) Apoptose zu induzieren

1.4.2 Redundanz von Bax und Bak

Genetische Experimente zeigen, dass die Überexpression von BH3-only Proteinen nur in Bax/Bak-profizienten nicht aber in Bax/Bak-defizienten Fibroblasten Cytochrom-c-Freisetzung auslöst [Zong et al., 2001]. Kürzlich veröffentlichte Studien schlagen vor, dass die Redundanz von Bax und Bak nur auf die durch bestimmte BH3-only Proteine induzierte Apoptose zutrifft, wie die von Bid oder Bim, wohingegen andere BH3-only Proteine präferentiell nur Bax oder Bak aktivieren. Dies kann zusätzlich noch Zelltyp- oder Stimulus-spezifisch erfolgen, was vermutlich auf ihre Bindungsaffinitäten zu bestimmten anti-apoptotischen Proteinen zurückzuführen ist. So löst Puma in Karzinomzellen Apoptose über einen rein Bax-abhängigen Mechanismus aus [Gillissen et al., 2003; Yu et al., 2003]. Analysen zur Regulierung von Bak in gesunden Zellen zeigen, dass Bak an Mcl-1 und Bcl-x_L gebunden ist, aber nicht an Bcl-2, Bcl-w oder Bfl-1 [Willis et al., 2005]. Diese Bindung beruht auf der BH3-Domäne von Bak und der hydrophoben Tasche von Mcl-1 bzw. Bcl-x_L. Gillissen et al. konnten 2007 zeigen, dass die Nbk-induzierte Apoptose Bax-abhängig ist, da Mcl-1 die Bak-Aktivierung verhindert. Reguliert man Mcl-1 durch siRNA herunter, kann auch Nbk Bak aktivieren [Gillissen et al., 2007]. Verschiedene Gruppen konnten eine Bindung von Bax an verschiedene anti-apoptotische Familienmitglieder nachweisen, wobei diese Interaktionen immer nur unter Verwendung von nichtionischen Detergenzien, welche die Konformation von Bax ändern, gezeigt werden konnten [Hsu und Youle, 1997]. Wie Bax letztlich reguliert wird ist unklar, da es in gesunden Zellen im Zytosol als Monomer vorliegt [Hsu und Youle, 1998]. Neue Veröffentlichungen zeigen immer wieder andere Interaktionen der verschiedenen Bcl-2 Familienmitglieder untereinander, wodurch die Komplexität der Wechselwirkungen umso deutlicher wird.

Wenn BH3-only Proteine spezifisch anti-apoptotische Mitglieder binden und diese wiederum spezifische pro-apoptotische Multidomänenproteine binden, lässt sich auf ein sehr fein reguliertes aber auch sehr komplexes System schließen. Auch die Regulation von Bax und Bak ist sehr diffizil und scheint entscheidend vom Expressionsstatus verschiedener Bcl-2 Familienmitglieder innerhalb der Zelle abhängig zu sein.

1.4.3 Aktivierung/Regulierung von BH3-only Proteinen

BH3-only Proteine werden durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert, wodurch Apoptose kontrolliert wird [Willis und Adams, 2005] (Abb. 5). So werden z.B. Puma, Nbk und Noxa_s auf transkriptioneller Ebene reguliert [Danial und Korsmeyer, 2004], d.h. in Folge von DNA-Schädigungen werden Noxa_s, Puma und Nbk durch den Transkriptionsfaktor p53 reguliert [Schuler und Green, 2001]. Posttranslationale Regulierung findet man z.B. bei der Phosphorylierung der BH3-Domäne von Bad durch PI3- und Akt-Kinasen [Cowburn et al., 2002; Li et al., 2001] oder der Aktivierung von Bid, welches erst durch Spaltung von Caspase-8, -10 oder Granzym B aktiviert wird. Die BH3-only Proteine Bim und Bmf sind an Komponenten des Zytoskeletts gebunden und werden aufgrund unterschiedlicher Stimuli aus diesem Verbund freigesetzt und dadurch aktiviert. Die Aktivierung von BH3-only Proteinen führt über die Inhibierung der anti-apoptotischen Proteine zur Aktivierung von Bax und Bak und damit zur Apoptose. Es ist daher von besonderem Interesse herauszufinden, ob verschiedene BH3-only Proteine selektiv oder redundant mit anderen anti-apoptotischen Proteinen interagieren, um den Mechanismus der Apoptoseinitiation aufzuklären und um neue Therapeutika, welche die Funktion von BH3-only Proteinen imitieren, entwickeln und zielgerichtet einsetzen zu können. Mittlerweile sind viele verschiedene Antikrebs-therapeutika, die spezifisch über BH3-only Proteine wirken, bekannt (Abb. 5). So regulieren Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren) Bmf auf Transkriptionsebene hoch [Zhang et al., 2006]. Auch Proteasominhibitoren wie Bortezomib scheinen über die Induktion verschiedener BH3-only Proteine zu funktionieren [Qin et al., 2005; Tan et al., 2005]. So sterben Melanomzellen, aber nicht normale Melanozyten, nach Bortezomibbehandlung aufgrund einer p53-unabhängigen Induktion von Noxa_s [Fernandez et al., 2005]. Die durch den Kinaseinhibitor Imatinib (Glivec) induzierte Apoptose beruht zum Teil auf der Aktivierung von Bim [Kuribara et al., 2004]. Auch in diesem Zusammenhang ist es wichtig, den genauen Mechanismus der Bcl-2 Interaktionen zu erforschen, um AntitumortheraPIen gezielt einsetzen und Resistenzen überwinden zu können.

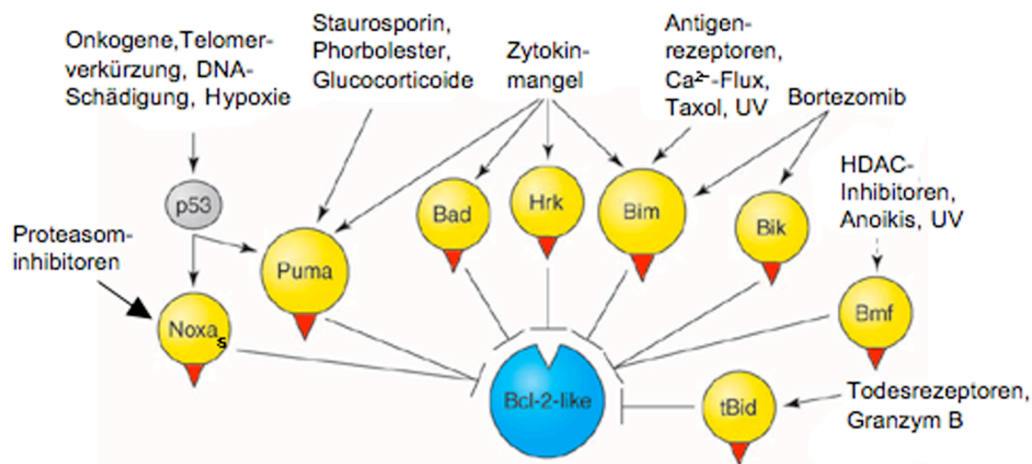


Abb. 5: BH3-only Proteine werden durch verschiedene Faktoren aktiviert (nach [Willis und Adams, 2005])

1.4.3.1 Das BH3-only Protein Noxa_s

Hijikata et al. beschrieben erstmals 1990 hohe Expressionsspiegel eines Gens in IKD Zellen (Zellen einer ATL (adulte T-Zell-Leukämie)) und peripheren mononukleären Blutzellen von ATL Patienten [Hijikata et al., 1990]. Dieses Gen konnte durch das Tumorpromotormitogen Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) transient induziert

werden und wurde als *APR* (ATL-derived PMA-responsive gene) bezeichnet. Das identifizierte Gen *APR* enthält einen offenen Leserahmen von 162bp und kodiert ein Protein mit 54 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 6 kDa. 2000 identifizierten Oda et al. mittels „mRNA differential display“ ein Gen, welches nach DNA-Schädigung in p53/IRF-1 doppeldefizienten MEFs (mouse embryonic fibroblast) ein geringeres Expressionsprofil aufwies als in wt MEFs. Das identifizierte murine Gen wurde *noxa* genannt (abgeleitet vom griechischen Wort für Schaden). Drei Exons kodieren ein 103 Aminosäuren langes Protein Noxa, im Folgenden Noxa_s genannt, mit zwei BH3-Domänen (in Exon 2 und 3) [Oda et al., 2000]. Eine geringe konstitutive Expression ist in verschiedenen Geweben adulter Mäuse wie Gehirn, Thymus, Milz, Lunge und Nieren nachweisbar. Die Überexpression von murinem Noxa_s in HeLa Zellen resultiert nach 24 Stunden in ca. 90 % der Zellen in Apoptose und kann durch die Überexpression von anti-apoptotischen Familienmitgliedern gehemmt werden [Oda et al., 2000]. Immunhistochemische Färbungen und subzelluläre Fraktionierungen weisen auf eine mitochondriale Lokalisation hin, die durch Mutationen in den BH3-Domänen verhindert wird. Oda et al. identifizierten auch im humanen System ein Noxa_s-homologes Protein und stellten fest, dass es mit dem zuvor von Hijikata entdecktem APR identisch ist. Somit sind für das humane Gen *noxa* verschiedene Synonyme wie *APR* oder *PMAIP1* bekannt. Weitere Untersuchungen von Oda et al. zum humanen Noxa_s zeigen, dass es im Gegensatz zum murinen Noxa_s nur eine BH3-Domäne besitzt, allerdings auch Apoptose in verschiedenen Zellsystemen induziert. Es besitzt in der Promotorregion eine p53-Konsensus-Bindungsstelle und vermittelt p53-abhängige Apoptose. Kontrovers zu diesen Ergebnissen sind die Ergebnisse von Chen et al., die zeigen, dass die Überexpression von humanen Noxa_s keine Apoptose induziert [Chen et al., 2005]. Aus diesem Grund haben sie Noxa_s innerhalb der BH3-Subfamilie in die Kategorie „schwacher Killer“ eingeordnet (siehe Abb. 4).

Die tumorbiologische und zellbiologische Bedeutung von Noxa_s wird in verschiedenen Studien belegt. So zeigen Noxa_s Knockout Studien, dass durch DNA-Schädigungen induzierte Apoptose in Noxa-null Fibroblasten gehemmt ist [Villunger et al., 2003] und Noxa_s für die UV-induzierte Apoptose in Keratinozyten und Fibroblasten verantwortlich ist [Naik et al., 2007]. Ein geringes Expressionsniveau von Noxa_s scheint mit einem schlechten Ansprechen auf Antikrebstherapeutika in B-CLL (chronisch-lymphatische B-Zell-Leukämie) einherzugehen [Smit et al., 2007]. Apoptose-resistente Melanomzellen resultieren nach Überexpression von Noxa_s in Apoptose, wodurch ein Noxa-Gentransfer eine komplementäre Funktion in der chemotherapeutischen Behandlung einnehmen könnte [Hassan et al., 2008]. Auch Nefedova et al. weisen auf einen sensitivierenden Effekt von Noxa_s auf Apoptose-resistente Zellen für das Ansprechen auf eine Chemotherapie hin [Nefedova et al., 2008]. Die Induktion von Apoptose in Krebszellen durch verschiedene Therapeutika wie Camptothecin, Bortezomib, Hyperforin oder Arsentrioxid scheint zu einem großen Anteil durch die Induktion von Noxa_s stimuliert zu werden [Mei et al., 2007; Morales et al., 2008; Rizzatti et al., 2008; Zaher et al., 2008]. Verschiedene Gruppen konnten zudem zeigen, dass Veränderungen der Genexpression von *PMAIP1* an der Entwicklung von Tumoren beteiligt sind [Kapoor, 2008].

Das anti-apoptotische Protein Mcl-1 wird in vielen Lymphomen und Tumoren überexprimiert [Warr und Shore, 2008]. Noxa_s wird als wichtigster Antagonist von Mcl-1 beschrieben, da es mit sehr hoher Affinität an Mcl-1 bindet [Chen et al., 2005]. Somit kann die Bindung von Noxa_s an überexprimiertes Mcl-1 zur Neutralisierung des anti-apoptotischen Signals führen, wodurch, wenn Bcl-x_L ebenfalls neutralisiert ist, Bak aktiviert wird und Apoptose eintritt.

Eine genaue Charakterisierung des Noxa_s-induzierten Zelltods ist dabei von entscheidender Bedeutung, um den Einsatz von Kombinationstherapien mit herkömmlichen Chemotherapeutika oder anderen spezifischen Antagonisten abzustimmen. Des Weiteren können Aufklärungen zum Mechanismus der Noxa_s-induzierten Apoptose Hinweise darauf geben, ob eine potentielle Noxa_s-aktivierende Therapie in bestimmten Tumoren, mit bestimmten Mutationen oder deregulierten Proteinen erfolgversprechend ist oder nicht.

1.5 Therapeutische Strategien

Moderne Antikrebsstrategien wenden sich langsam von unspezifischen, zytotoxischen Agenzien ab hin zu rational entwickelten Therapeutika, welche wohldefinierte Ziele in bekannten in Tumorgenese involvierten Signaltransduktionsketten inhibieren. Säugetiere kontrollieren ihre Gewebshomöostase durch Apoptose, was die Elimination von infizierten, geschädigten, transformierten oder anderweitig ungewollten Zellen ermöglicht. Somit fungiert die Apoptosemaschinerie als eine Barriere gegen Krebs, ist aber auch limitierend für die Effizienz vieler Antikrebstherapien. Eine Schlüsselhypothese vieler dieser neuen Strategien ist, dass das Aufrechterhalten und der Fortschritt von Tumoren entscheidend von der Apoptoseresistenz transformierter Zellen abhängen. Solche neuartigen und molekular definierten Therapieansätze basieren z.B. auf monoklonalen Antikörpern, die an Zelloberflächenrezeptoren binden bzw. regulatorisch wichtige Proteine hemmen, oder auf niedermolekularen Kinase-Inhibitoren, die in wichtige Apoptosesignalwege eingreifen (Abb. 6). Aufgrund der hohen Spezifität sind sie mit deutlich weniger Nebenwirkungen als konventionelle Chemotherapeutika oder ionisierende Bestrahlung verbunden.

Ein Ziel der Antikrebstherapie ist die Aktivierung von TRAIL-Rezeptoren, die in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert sind und nach DNA-Schädigung über einen p53-abhängigen Signalweg hochreguliert werden (Abb. 6). Ein besonderes therapeutisches Potential wird daher dem Todesliganden TRAIL zugeschrieben [Wendt et al., 2005]. TRAIL entfaltet seine Wirkung, indem es an die TRAIL-Rezeptoren DR (Todesrezeptor)4 und DR5 bindet und hierdurch die Bildung des DISC aus dem Rezeptor, dem zytosolischen Adapterprotein FADD und der Initiatorcaspase-8 initiiert. Die aktivierte Caspase-8 aktiviert in der Folge nachgeschaltete Caspasen als Effektoren des apoptotischen Zelltods. Durch TRAIL-Rezeptor-Aktivierung wird somit in den meisten Tumoren eine Apoptose induziert, die den DNA-Schädigungs-induzierten Zelltod synergistisch verstärken kann. TRAIL vermittelt zusätzlich die Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs. Dieser Effekt wird vollständig über das BH3-only Protein Bid vermittelt, das durch Caspase-8 und -3 zum tBid gespalten und hierdurch aktiviert wird.

Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53, z.B. durch Antagonisierung des p53-Inhibitors Hdm-2, der als E3-Ubiquitinligase für p53 wirkt und über die Ubiquitinierung von p53 dieses für den Abbau über das Proteasom markiert (Abb. 6). Die Hemmung von Hdm-2 gelingt durch eine neue Klasse von Substanzen, den Nutlinen, die an Hdm-2 binden und hierdurch die Interaktion von Hdm-2 mit p53 behindern [Vassilev et al., 2004]. Dies stellt in Hdm-2-überexprimierenden Tumorzellen die p53-Funktion wieder her und resultiert in Zellzyklusarrest oder Apoptose [Stuhmer et al., 2005].

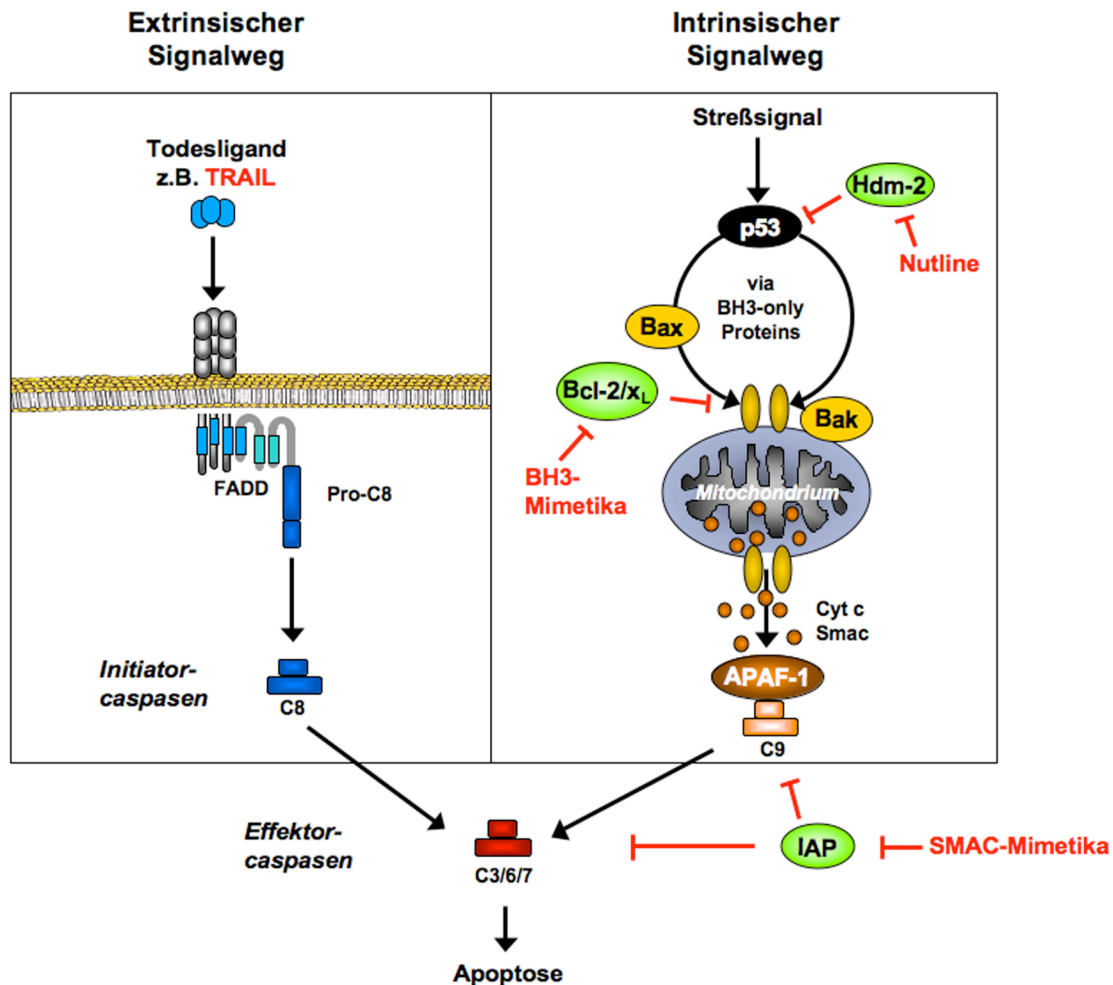


Abb. 6: Wirkmechanismus potentieller Antikrebstherapeutika [Daniel, 2008]

Gezeigt ist der extrinsische und intrinsische Apoptose-Signalweg. Der extrinsische Signalweg kann durch TRAIL aktiviert werden. TRAIL bindet an die Todesrezeptoren DR4 und DR5, wodurch die Bildung des DISC aus Rezeptor, FADD und Procaspase-8 initiiert wird. Procaspase-8 aktiviert die Effektorcaspasen, welche zur Exekution der Zelle führen. Der intrinsische Signalweg kann z.B. durch Nutline aktiviert werden. Diese inhibieren Hdm-2. Hdm-2 ubiquitiniert p53 und vermittelt somit den Abbau von p53 über das Proteasom. Wird Hdm-2 inhibiert ist p53 frei und kann durch die Aktivierung von Zielgenen (z.B. BH3-only Proteine) Apoptose induzieren. BH3-Mimetika bzw. Bcl-2 Inhibitoren binden an Bcl-2 oder Bcl-x_L. Dadurch werden Bax und Bak frei und oligomerisieren in der äußeren Mitochondrienmembran. Dies wiederum führt zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus dem Mitochondrium und zur Aktivierung der Caspasen. SMAC-Mimetika hemmen IAPs, dadurch werden die Caspasen nicht gehemmt und können aktiviert werden.

Die verschiedenen Signalwege der Apoptose laufen auf der Ebene der Aktivierung von Effektorcaspasen zusammen, was dazu führte, dass auch diese Moleküle als ideale Ziele für die Entwicklung neuer Medikamente herangezogen wurden. Caspaseaktivierung wird durch die Familie der IAPs (Inhibitoren der Apoptose Proteine) gehemmt. Außerdem werden IAPs in vielen Tumoren eine Rolle bei der Pathogenese und/oder Medikamenten-resistenz zugeteilt [Vucic und Fairbrother, 2007]. Die IAP-Caspase-Interaktionen werden durch Antagonisten der IAPs wie z.B. Smac inhibiert. Der biologische Wirkmechanismus wurde daher genutzt, um neue Therapeutika zu entwickeln, welche auf die IAP-Caspase-Interaktionen abzielen und die Funktion von Smac imitieren.

Bcl-2 Inhibitoren werden in Hinblick auf die Behandlung von Tumoren mit überexprimierten anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern als vielversprechende Therapeutika gehandelt und im Folgenden genauer vorgestellt.

1.5.1 Bcl-2 Inhibitoren

Ob eine Zelle im Zuge von Stresssignalen den intrinsischen Apoptosesignalweg aktiviert und dies zur Exekution dieser führt, hängt entscheidend von dem komplexen Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Bcl-2 Familienmitgliedern ab. Hohe Genexpressionsspiegel von Bcl-2 sind in vielen verschiedenen humanen Tumoren zu finden. Bcl-2 wird außerdem mit Chemoresistenz in Zusammenhang gebracht, da eine Überexpression von Bcl-2 den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika durch die Blockierung der Apoptose hemmt. Bcl-2 und dessen identifizierte Homologe sind vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von neuen Antikrebstherapien. Bcl-2 Familienmitglieder sind intrazelluläre Proteine, die keine intrinsische katalytische Funktion besitzen, was das Bestreben förderte, die mRNA-Expressionsspiegel mit Nuklease-resistenten Antisense-Oligonukleotid-basierten Strategien zu hemmen [Kim et al., 2007]. Oblimersen (Genasense) [Banerjee, 2001] ist ein 18bp Phosphorothioat-Oligonukleotid, welches die ersten sechs Kodons der *bcl-2* mRNA bindet. Erste Ergebnisse zeigen, dass es für die Behandlung von verschiedenen Tumoren geeignet ist [Rudin et al., 2004]. Eine weitere mögliche Methode ist die Gentherapie, wobei rekombinante Adenoviren mit einem proapoptotischen Gen z.B. Bax oder Nbik versehen, auf transformierte Zellen abzielen und somit gezielt Apoptose auslösen [Gu et al., 2000]. Die Verwendung von synthetischen BH3-Peptiden wurde vorgeschlagen, um den zytoprotektiven Effekt von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L durch direkte Bindung in der hydrophoben Furche zu hemmen und Apoptose durch das Freiwerden von Bax und Bak zu aktivieren bzw. die protektiven Effekte von Bcl-2 oder Bcl-x_L zu antagonisieren und dadurch für z.B. DNA-schädigende Agenzien zu sensibilisieren [Holinger et al., 1999; Juin et al., 2002]. Problematisch bei der Verwendung von Peptiden ist die Instabilität durch die kurze α -helikale Struktur und die schlechte Zellpermeabilität. In den letzten Jahren wurden zum einen verschiedene synthetische Substanzen wie ABT737 [Oltersdorf et al., 2005], ABT263 [Tse et al., 2008] oder Obatoclax (GeminX) [Trudel et al., 2007] und zum anderen eine Vielzahl von natürlichen Substanzen als potentielle Inhibitoren von Bcl-2 identifiziert, welche besser zellpermeabel und stabiler sind. Die meisten natürlichen Moleküle wurden ursprünglich durch Methoden identifiziert, die auf die Struktur oder Funktion der BH3-Bindungsstelle fokussiert waren. So wurden einige durch *in silico* Substanzsuchen und andere durch Hochdurchsatz-Fluoreszenz-polarisationsverfahren entdeckt. Das Polyphenol Gossypol (Abb. 7A) wird aus Baumwollextrakten gewonnen und wurde ursprünglich in China als Verhütungsmittel für Männer untersucht. 2003 konnten Kitada et al. durch die Verwendung einer Kombination aus NMR-basierten Bindungsstudien und Fluoreszenzpolarisations-verdrängungsverfahren zeigen, dass Gossypol die BH3-Peptid-Bcl-x_L-Bindung hemmt [Kitada et al., 2003]. Gossypol interagiert direkt mit Resten der hydrophoben Bindungstasche von Bcl-x_L und verdrängt dadurch aus dieser BH3-Peptide. Erste Untersuchungen zu Gossypol ergaben, dass es Caspase-abhängig Apoptose induziert [Kitada et al., 2003]. Die organische Substanz HA14-1 (Abb. 7A, B) wurde 2000 durch die Verwendung einer Computer-Screening-Methode entdeckt [Wang et al., 2000]. Die 3D-Struktur von Bcl-2 (Oberflächenstruktur der BH1-3 Domänen) wurde als Zielsequenz und somit für das Durchsuchen einer Substanzdatenbank verwendet. Die vorhergesagte Bindung von HA14-1 an Bcl-2 wurde mittels kompetitiven Fluoreszenzpolarisationsverfahren bestätigt und die Fähigkeit der Caspase-abhängigen Apoptoseinduktion in HL-60 gezeigt. Die niedermolekulare Substanz BH3I-2' (Abb. 7A, C) wurde durch ein Hochdurchsatzverfahren basierend auf Fluoreszenzpolarisation entdeckt [Degterev et al., 2001], wobei es die Bindung zwischen BH3-Peptid und verschiedenen antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen dosisabhängig antagonisierte. Es konnten zu dem Strukturveränderungen von Bcl-x_L in der Bindungstasche nach Bindung von BH3I-2' und die Induktion von Apoptose gezeigt werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurden Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' als Bcl-2 Inhibitoren oder auch BH3-

Mimetika bezeichnet, da sie die Funktion von BH3-only Proteinen imitieren. Die Untersuchung der genauen Wirkmechanismen dieser Substanzen ist unerlässlich, um die Verwendung als potentielle Therapeutika richtig einstufen zu können.

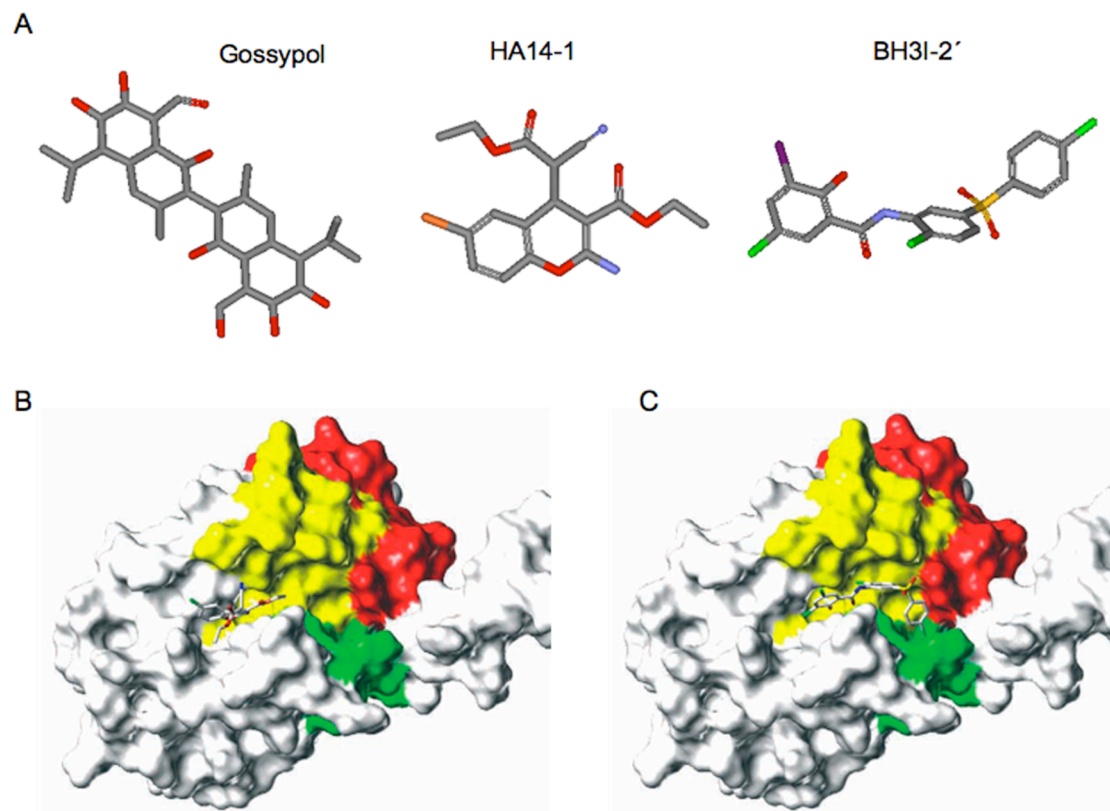


Abb. 7: Niedermolekulare, organische Bcl-2 bzw. Bcl-x_L Antagonisten

A Stabmodelle von Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' (Grau: Kohlenstoff, Rot: Sauerstoff, Grün: Chlor, Blau: Stickstoff, Gelb: Schwefel, Violett: Jod, Orange: Brom)

B 3D-Modell von Bcl-x_L (BH1-Domäne: gelb; BH2-Domäne: rot; BH3-Domäne: grün) mit gebundenem HA14-1 [Juin et al., 2004]

C 3D-Modell von Bcl-x_L (BH1-Domäne: gelb; BH2-Domäne: rot; BH3-Domäne: grün) mit gebundenem BH3I-2' [Juin et al., 2004]

2 Zielsetzung

Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der sowohl mit Tumorgenese als auch mit Antikrebstherapieresistenz in Verbindung gebracht wird. Die Regulation erfolgt dabei über distinkte Signalwege. Es werden der intrinsische und extrinsische Apoptosesignalweg unterschieden. Der intrinsische Signalweg, auch mitochondrialer Signalweg genannt, wird über interne Stresssignale initiiert und durch die Bcl-2 Familie kontrolliert. Die Bcl-2 Familie wird in drei Subfamilien unterteilt: die anti-apoptotische Bcl-2 Subfamilie u.a. mit Bcl-2, Mcl-1 und Bcl-x_L, die pro-apoptotische Bax-Subfamilie u.a. mit Bax und Bak und die pro-apoptotische BH3-only Subfamilie u.a. mit Noxa, Nbk und Bim. Das Verhältnis der Bcl-2 Familienmitglieder innerhalb einer Zelle bestimmt ob diese stirbt oder nicht. In vielen Tumoren ist die Regulation der Apoptose durch die Bcl-2 Familie und somit auch die Regulation/Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs gestört. So wird z.B. die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie in vielen verschiedenen Tumortypen mit verlängertem Zellüberleben sowie Therapieresistenz in Verbindung gebracht [Chanan-Khan, 2005; Osford et al., 2004], die maligne Transformation von Tumorzellen durch die Inaktivierung von BH3-only Proteinen begünstigt [Egle et al., 2004; Sturm et al., 2006] und auch der Verlust des pro-apoptotischen Proteins Bax wird in vielen Therapie-resistenten Tumoren beobachtet [Sturm et al., 1999]. Aus diesem Grund werden seit den 1990er Jahren u.a. Bcl-2 und Bcl-x_L als Ziele für Antikrebstherapien genauer untersucht. Alle Mitglieder der anti-apoptotischen Subfamilie bilden an der Oberfläche der Proteine aus den BH1-3-Domänen eine hydrophobe Tasche, welche die inhibitorische Bindung pro-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder über die BH3-Domäne ermöglicht. Eine vielversprechende Strategie, die Apoptoseresistenz von Tumoren zu überwinden, ist daher die direkte Antagonisierung von Bcl-2 oder Bcl-x_L durch niedermolekulare Substanzen, wie BH3-Mimetika, welche BH3-only Proteine, Bax oder Bak aus der Bindung mit Bcl-2 bzw. Bcl-x_L verdrängen können und dadurch den intrinsischen Signalweg induzieren. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die drei vielversprechenden Bcl-2 Inhibitoren Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' und deren Wirkmechanismen zu untersuchen. Zum einen soll der Einfluss der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L auf die Wirkung der BH3-Mimetika und zum anderen der Zusammenhang zwischen der Wirkung der Bcl-2 Inhibitoren und Bax bzw. Bak analysiert werden.

Eine weitere Möglichkeit, Apoptose-resistente Tumore für Apoptose zu sensitivieren besteht darin, pro-apoptotische BH3-only Proteine gezielt in Tumoren zu aktivieren. Es ist dabei unabdingbar, den genauen Wirkmechanismus der eingesetzten BH3-only Proteine zu kennen, um sie richtig einsetzen zu können. Bisher konnte gezeigt werden, dass verschiedene BH3-only Proteine zum Teil selektiv an andere anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder binden und dadurch Bax und Bak aus der inhibitorischen Bindung freigesetzt werden und die Apoptosekaskade induziert wird. Noxa_S ist ein Mitglied der BH3-only Subfamilie, wobei die bisherigen Veröffentlichungen kontrovers sind. So konnten Oda et al. zeigen, dass die Überexpression von Noxa_S Apoptose induziert [Oda et al., 2000], wohingegen Chen et al. nach Überexpression von Noxa_S keine Apoptose detektieren [Chen et al., 2005]. Zudem wurde für Noxa_S eine hohe Bindungsaffinität zu Mcl-1 beschrieben, was darauf hindeutet, dass Noxa_S nur in Bak-exprimierenden Tumoren verwendet werden könnte. Welche Funktion Noxa_S im Zuge des Zelltods spielt, ob die alleinige Expression von Noxa_S ausreicht Apoptose zu induzieren und welche Rolle andere Bcl-2 Familienmitglieder dabei spielen, soll im Zuge dieser Arbeit untersucht werden.

Das Gen *noxa* kodiert neben dem BH3-only Protein Noxa_S für das nicht genauer charakterisierte Protein Noxa_L. Noxa_L besitzt im Vergleich zu Noxa_S keine BH3-Domäne, wodurch sich die Frage ergibt, ob beiden Spleißvarianten durch gleiche Stimuli induziert werden und Apoptose-induzierende Eigenschaften besitzen.

3 Material

3.1 Zelllinien

HCT116 wt	[Brattain, et al., 1981][Brattain et al., 1981]
HCT116 Bax knock out (Bax-)	[Zhang et al., 2000]
HCT116 Bak knock down (Bak-)	[Subramanian und Chinnadurai, 2003]
HCT116 Bax knock out / Bak knock down (Bax-/Bak-)	[Subramanian und Chinnadurai, 2003]
HEK 293	[Graham et al., 1977]
HL60	[Collins et al., 1977]
U937	[Sundstrom und Nilsson, 1976]
DU145 wt	[Mickey et al., 1980]
DU145 Hytk2 (mock)	[von Haefen et al., 2002]
DU145 Bax3 (Bax)	[von Haefen et al., 2002]
DU145 EGFP-Bak	[von Haefen et al., 2004]
DU145 EGFP-Bax	[von Haefen et al., 2004]
HeLa	[Scherer et al., 1953]
Jurkat mock	[Klopfer et al., 2004]
Jurkat Bcl-x _L	[Klopfer et al., 2004]
BJAB mock	[Fulda et al., 2001]
BJAB Bcl-x _L	[Fulda et al., 2001]

3.2 Adenoviren als Gentransfervektoren

AdNoxa_S

AdNoxa_L

3.3 Vektoren

pcDNA3.1+	Invitrogen, Karlsruhe
pTet-off	BD Biosciences Clontech, CA, USA
pAd2-TRE	[Gillissen et al., 2003]

pAd-Del.1.3+tTA

[Gillissen et al., 2003]

3.4 Zellkulturmedien

DMEM/high Glucose (4.5 g/l) Medium komplementiert mit 10 % FCS (30 Minuten (min), 56 °C inaktiviert) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles von GIBCO, Karlsruhe)

RPMI 1640 Medium ergänzt mit 10 % FCS (30 min, 56 °C inaktiviert) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles von GIBCO, Karlsruhe)

Opti-MEM ohne Zusätze oder ergänzt mit 10 % FCS (30 min, 56 °C inaktiviert)

3.5 Chemikalien

Es wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades verwendet.

β -Mercaptoethanol	Fluka, Taufkirchen
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	AppliChem, Gatersleben
Bacto-Agar	Becton Dickenson, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton Dickenson, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	Becton Dickenson, Heidelberg
BCA Protein Assay Reagent B	Pierce, Bonn
BCA Protein Assay Reagenz A	Pierce, Bonn
Blockingreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Merck, Darmstadt
CAPS	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
DharmaFect	Dharmacon, Perbio, Bonn

DMEM/high Glucose (4.5 g/l) Medium	GIBCO, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP's	Invitek, Berlin
Doxycycline Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence)	Pierce, Bonn
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T.Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FBS	Gibco, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Media	Dako, Hamburg
Gel Loading Solution	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	GIBCO, Karlsruhe
Glycerin	J.T.Baker, Griesheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
JC-1 (5,5',6,6' Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-BenzimidazolyI-Carbocyaninjodid)	Molecular Probes, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine 2000	Molecular Probes, Eugene, USA
Magnesiumchlorid	Invitek, Berlin
Methanol	J.T.Baker, Griesheim
MG132	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacid	Sigma, Taufkirchen
Opti-MEM	Gibco, Karlsruhe
Q-VD-OPh	Calbiochem, Bad Soden
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe

PBS	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	GIBCO, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Fluka, Taufkirchen
Tris Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (1X)	Life Technologies, Schwalbach

3.6 Enzyme, Proteine, Marker und Peptide

1 kb Plus DNA Leiter	GIBCO Life Technologies GmbH, Karlsruhe
BioScript	Bioline, Luckenwalde
DNase freie RNaseA	Roche Diagnostics, Mannheim
PfuTurbo-Polymerase	Stratagene, Kalifornien, USA
Platinum-Taq	Invitrogen, Karlsruhe
Q-VD-OPh	Calbiochem, Darmstadt
Rainbowmarker	Amersham, Braunschweig
Restriktionsenzyme	NEB GmbH, Frankfurt/Main
Ribonuclease Inhibitor	Bioline, Luckenwalde

T4-DNA-Ligase

Life Technologies, Schwalbach

Taq-Polymerase

Invitek, Berlin

3.7 Primer und Primersequenzen

Random-Hexamer-Primer

Bioline, Luckenwalde

Primersequenzen zur Amplifikation von E1A- und E4-Fragmenten von Adenovirus Typ 5 [Adesanya et al., 1996]:

E1A: Forward primer: 5' - GAG ACA TAT TAT CTG CCA CGG AGG - 3'

Reverse primer: 5' - TTG GCA TAG AAA CCG GAC CCA AGG - 3'

E4: Forward primer: 5' - GTA GAG TCA TAA TCG TGC ATC AGG - 3'

Reverse primer: 5' - TTT ATA TGG TAC CGG GAG GTG GTG - 3'

Primersequenzen mit Restriktionsschnittstellen zur Amplifikation von Noxa_S- und Noxa_L-Fragmenten:

Noxa_S: *Bam*HI-Noxa_S- forward: 5' - AAG GAT CCA TGC CTG GGA AGA AG - 3'

*Xba*I- Noxa_S- reverse: 5' - ACT CTA GAC TCA GGTTC TGA GCA - 3'

Noxa_L: *Bam*HI-Noxa_L-forward: 5' - AAG GAT CCA TGC CTG GGA AGA AG - 3'

*Xba*I-Noxa_L-reverse: 5' - ACT CTA GAC TCA ATT ACA ATG CAG - 3'

Primersequenzen zur Amplifikation von Noxa_L-Fragmenten mittels RT-PCR:

Noxa_L: forward: 5' - GAG GAA CAA GTG CAA GT - 3'

reverse: 5' - GCA GAA GAG TTT GGA TAT CAG - 3'

Noxa_L-Sonde: 5'- 6FAM - AAG TCG AGT GTG CTA CTC AAC TCA - TMR - 3'

G6PDH: forward: 5' - ATC GAC CAC TAC CTG GGC AA - 3'

reverse: 5' - TTC TGC ATC ACG TCC CGG A - 3'

Sonde: 5' - 6FAM - AAG ATC CTG TTG GCA AAT CTC AGC ACC A- TMR - 3'

c-Abl: forward: 5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'

reverse: 5' - GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'

Sonde: 5' - 6FAM - CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT T - TMR - 3'

Primersequenzen zur Amplifikation von Noxa_S und Noxa_L-Fragmenten (pGemT-Klonierung):

Noxa_S/Noxa_L: Exon 1-forward: 5' - GCA AGA ACGC TCA ACC GAG - 3'

Exon 3-reverse: 5' - TGA GCA GAA GAG TTT GGA - 3'

Noxa_L: Exon 2-forward: 5' - TTT CCT CCT CTC TTT CCT CCT CGC - 3'

Exon 3-reverse: 5' - CCA AATC TCC TGA GTT GAG TAG CAC - 3'

3.8 Antikörper

Der sekundäre, HRP (horse radish peroxidase)-konjugierte Antikörper (anti-Maus, anti-Kaninchen, anti-Ziege) wurden von Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA bezogen. Der sekundäre Alexa Fluor 488-konjugierte, Alexa Fluor 594-konjugierte und der sekundäre Alexa Fluor 568-konjugierte Antikörper (anti-Maus, anti-Kaninchen, anti-Ziege) stammen von Molecular Probes Eugene, USA.

Tab. 1: Antikörper

Antigen	Verdünnung	Spezies	Bestellnummer	Firma
Aktin	1:1000	polyklonal, Kaninchen	A 2066	Sigma, Deisenhofen
Noxa	1:200	polyklonal, Ziege	sc-26917 (N-15)	Santa Cruz, Kalifornien USA
Mcl-1	1:200	polyklonal, Kaninchen	sc-20679 (FL-54)	Santa Cruz, Kalifornien USA
PARP	1:1000	polyklonal, Kaninchen	9542	Cell Signaling technologies, Frankfurt a.M.
Caspase-3	1:1000	polyklonal, Ziege	AF-605-NA	R+D Systems, Wiesbaden
Caspase-9	1:1000	polyklonal, Ziege	AF 8301	R+D Systems, Wiesbaden
Bcl-x	1:1000	polyklonal, Kaninchen	BD 556361	BD Pharmingen, Heidelberg
Bcl-x	1:1000	polyklonal, Kaninchen	BD 610212	BD Pharmingen, Heidelberg
Tom20	1:1000	monoklonal, Maus	BD612278	BD Pharmingen, Heidelberg
c-Myc	1:200	monoklonal, Maus	sc-40 (9E10)	Santa Cruz, Kalifornien USA
c-Myc	1:200	polyklonal, Kaninchen	sc-789 (A14)	Santa Cruz, Kalifornien USA
Bak	1:1000	polyklonal, Kaninchen	5897	Sigma, Deisenhofen
Bax	1:1000	polyklonal, Kaninchen	554104	BD Pharmingen, Heidelberg
Bcl-2	1:200	monoklonal, Maus	NCL-bcl-2-486	Novo Castra, Wetzlar
Bim	1:1000	polyklonal, Kaninchen	2819	Cell signaling technologies, Frankfurt a.M.
Bax-NT	1:1000	polyklonal, Kaninchen	06-499	Upstate, Schwalbach
Bak-NT (Ab-2)	1:100	monoklonal, Maus	AM04	Calbiochem, Darmstadt

3.9 Kits

Carboxyfluorescein FLICA Apoptosis Detection Kit	Axxora, Lausen, Schweiz
Invisorb Plasmid Maxi Kit	Invitex, Berlin
Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit	Invitex, Berlin
pGEM-T Cloning-Kit	Promega, Mannheim
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.10 Membranen

Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Nitrocellulose Transfermembran, BA 85, 0.45 µm	Schleicher und Schuell, Dassel
Nitrocellulose Transfermembran, BA 83, 0.2 µm	Schleicher und Schuell, Dassel

3.11 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5α Zellen (Recombinase defizient, Amplifikation von rekombinanten Plasmiden)

Genotyp: *F- deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-,mk+) supE44 I- thi1 gyrA96 relA1*

Escherichia coli BJ5183 Zellen (homologe Rekombination)

Genotyp: *endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR* (Strr).

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Alle folgenden molekularbiologischen Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press von Maniatis et al. [Maniatis, 1989] entnommen.

LB-Medium: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl mit H₂O auf 1000 ml; autoklavieren

LB-Agar: LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar; autoklavieren; nach Abkühlung auf unter 50 °C Zusatz des jeweiligen Antibiotikums

4.1.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Es wurden 500 ml LB-Medium in einem 2l Erlenmeyerkolben mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C auf einem Bakterienschüttler bei 230 upm inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde durch Messung der OD₅₉₅ nm verfolgt. Bei einer OD₅₉₅ nm von 0,6 wurden die Bakterien pelletiert. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Elektroporation von Bakterien ist das Absenken des Salzgehaltes der Zellen durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest.. Das Pellet wurde hierfür in eiskaltem Aqua dest. resuspendiert und erneut bei 4 °C zentrifugiert. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurde das Bakterienpellet in 3 ml einer kalten 10 %igen Glycerinlösung resuspendiert. Die Bakterien wurden dann entweder direkt zur Elektroporation verwendet oder in 100 µl Aliquots bei –80 °C eingefroren.

4.1.2 Klonierungen

Zur Vorbereitung des Vektors wurden Restriktionsenzyme für entsprechende Schnittstellen in der "multiple cloning site" (MCS) des Vektors ausgewählt und das Plasmid damit gemäß den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers verdaut. Das DNA-Fragment wurde parallel dazu ebenfalls mit Restriktionsenzymen behandelt, die die gerichtete Klonierung in das Plasmid ermöglichen. Die Restriktionsreaktion wurde durch Agarosegeleanalyse auf ihren Erfolg hin überprüft. Der Reaktionsansatz wurde dann elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Fragment ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Für die anschließende Ligation wurden geschnittenes Vektorplasmid und Fragment in einem molaren Verhältnis von eins zu sechs eingesetzt und zusammen mit T4-DNA-Ligase (Life Technologies, Schwalbach) in Ligationspuffer (Life Technologies, Schwalbach) mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Mit Hilfe der DNA-Konzentration (siehe Kapitel 1.4.6) und der Fragmentgröße wurde berechnet wie viel von dem Vektorplasmid und dem Fragment eingesetzt werden musste, um das gewünschte molare Verhältnis zu erhalten. Der Ligationsansatz wurde anschließend in Bakterien transformiert (siehe Kapitel 4.1.3).

4.1.3 Transformation von Bakterien

4.1.3.1 Hitzeschocktransformation

Für die Transformation wurden 50 ng DNA (oder 10 µl Ligationsansatz) und 20 µl kompetente *E. coli* Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 90-120 s bei 42 °C inkubiert und danach sofort für 12 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 400 µl LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum wurden die transformierten Bakterien für 30 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend 250 µl der Bakteriensuspension auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte ausplattiert. Die LB-Agarplatten enthielten das Selektionsantibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml.

4.1.3.2 Elektroporation

Die Verwendung kurzer elektrischer Impulse zum Einbringen von DNA in Zellen wird als Elektroporation bzw. Elektrotransfektion bezeichnet [Chu et al., 1987; Neumann et al., 1982]. Diese Methode wird bei einem breiten Spektrum tierischer und pflanzlicher Zellen sowie Bakterien erfolgreich angewendet. Bei der Elektroporation wird durch das Anlegen von elektrischen Impulsen die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig so erhöht, dass DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Für die Transformation wurden 100 µl elektrokompente Bakterien mit DNA gemischt und auf Eis in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mittels eines Elektroporationsgeräts (Elektroporator Gene Pulser II) von BioRad bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Direkt nach dem Puls wurden die Zellen mit 1000 µl LB-Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und im Schüttler bei 37 °C inkubiert. 20 bis 100 µl wurden dann auf Antibiotika enthaltenden Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkolonien

4.1.4.1 Minipräparation

Die Plasmid-DNA-Isolation wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979] mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit (Invitex, Berlin), wie vom Hersteller beschrieben, aus 1,5 ml Übernachtskultur durchgeführt. Für die Übernachtskultur wurde ein Klon gepickt und in 2 ml mit Ampicillin versetzten LB-Medium über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert.

4.1.4.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus einer 200 ml Übernachtskultur mit Hilfe des Invisorb Plasmid Maxi Kits (Invitex, Berlin) gewonnen. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.1.4.3 DNA-Präzipitation

Die Fällung von DNA erfolgte durch die Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen EtOH (100 %) für 20 min bei -20 °C. Die gefällte DNA wurde 20 min bei 12000 upm (4 °C)

zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml EtOH (70 %) gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet nochmals 10 min bei 12000 upm (4 °C) zentrifugiert und 10 min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in dH₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

4.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA in Agarosegelen ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Durch das Anlegen einer Spannung läuft die DNA aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat bei neutralem pH von der Kathode zur Anode. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert während der Elektrophorese zwischen die Basen der DNA und emittiert nach Anregung mit UV-Licht sichtbares Licht. Die gleichzeitige Auftrennung von Größenmarkern bekannter Länge ermöglicht die Bestimmung der DNA-Fragmentgröße. Die Agarosekonzentration ist dabei entscheidend zur optimalen Auftrennung verschieden großer DNA Fragmente. So wird die Auftrennung kleiner Fragmente (0,1 – 1 kb) bei höheren Agarosekonzentrationen (2-3 %ig) begünstigt, wohingegen für Fragmente bis 30 kb 0,6 %ige Gele Verwendung finden. Unter Berücksichtigung der Länge der zu untersuchenden Fragmente wurden 0,6 - 3 %ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Agarosemenge wurde in der Mikrowelle mit 1x TAE unter Kochen gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 50-60 °C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt und in eine vorbereitete Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose und Entfernen des Kammes wurde die Kammer mit 1x TAE gefüllt. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probentaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 90 Volt. Die DNA-Fragmente wurden nach dem Gellauf unter UV-Licht begutachtet und fotografiert. Bei präparativen Agarosegelen wurde die gewünschte DNA-Bande ohne vorherige UV-Lichtbetrachtung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und zur Weiterverarbeitung aufgereinigt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat (pH 8,5); 1 mM EDTA

10x Probenpuffer: 50 % Glycerin, 14 mM EDTA pH 8,0, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau,
0.25 % (w/v) Xylencyanol

4.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O in einer Quarzküvette. Eine OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

4.1.7 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von RNA wurden ca. 1x10⁶ Zellen pelletiert und anschließend das RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden die Proben mittels Insulinspritze resuspendiert und lysiert und in Gegenwart des denaturierenden Guanidinium-Isothiocyanat (GITC)-Puffers, der RNasen inaktiviert, homogenisiert. Die RNA wurde an Silicagel-Membranen gebunden, gewaschen und mit DEPC-Wasser eluiert. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.8 Herstellung von cDNA durch RT-PCR

Ausgehend von 1 µg Gesamt-RNA erfolgte die Generierung von cDNA durch reverse Transkription (RT). Dabei wurde die Gesamt-RNA zunächst mit 4 µl Random-Hexamer-Primern bei 25 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Reverse-Transkriptase-Mix dazugegeben und bei 37 °C für 60 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde dieses Gemisch 10 min bei 70 °C inkubiert.

Reverse-Transkriptase-Mix: 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,25 µl RNase-Inhibitor, 0,25 µl Bioscript
(reverse Transkriptase), 0,4 µl 50x dNTPs, ad 8 µl H₂O

4.1.9 Real-time PCR (Taqman-Prinzip)

Um die Veränderungen des mRNA-Niveaus nach Behandlung detektieren zu können, wurden Zellen geerntet und die RNA isoliert. Diese RNA wurde mittels Random-Hexamer-Primer und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Aus dieser cDNA wurden mittels Taqman-PCR *noxas*, *noxal* und das Referenzgen *c-Abl* bzw. *G6PDH* amplifiziert. *Noxas* bzw. *noxal* wurden gegen *c-Abl* oder *G6PDH* normalisiert, wodurch sich die relative Genexpression bestimmen ließ.

Das Prinzip der Real-time quantitativen PCR wurde von Heid et al. detailliert beschrieben [Heid et al., 1996]. Die RT-PCR (Taqman-Prinzip) basiert auf der Detektion und Quantifizierung eines Fluoreszenz-Reporters, dessen Fluoreszenzsignal direkt proportional zur Menge des PCR-Produktes in einer Probe ansteigt. Die Detektion der Fluoreszenz-Emission ermöglicht damit die Messung der cDNA-Menge während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion in Echtzeit (real-time). Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber anderen quantitativen RT-PCR Methoden dar, die nur das amplifizierte Endprodukt detektieren. Die Taqman-Reaktion ist die am häufigsten verwendete Methode der Real-time PCR. Dabei wird zusätzlich zu den beiden sequenzspezifischen Primern eine Taqman-Sonde in die Reaktion gegeben. Taqman-Sonden sind Oligonukleotide (16-30 Basen), die an einer internen Region des PCR-Produktes binden können, sowie an der 5'Base mit einem Fluoreszenz-Reporter und an der 3'Base mit einem Quencher markiert sind. Nach Anregung wird die Energie des Fluoreszenz-Reporters auf den nahe gelegenen Quencher übertragen. Dadurch verhindert die räumliche Nähe von Fluoreszenz-Reporter und Quencher die Emission von Fluoreszenz solange die Sonde intakt ist. Während der PCR-Reaktion wird das Template durch die Taq-Polymerase repliziert, bis sie auf die gebundene Taqman-Sonde trifft. Die 5'Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase baut die Sonde ab. Dadurch entsteht das quantifizierbare Fluoreszenzsignal. Die Fluoreszenz steigt in jedem Amplifikationszyklus proportional zur Sondenspaltung. Die relative Genexpression der spezifisch amplifizierten cDNA kann durch die gleichzeitige Amplifikation eines Referenzgens, wie *G6PDH* oder *c-Abl* in der Probe bestimmt werden. Die Real-time PCR wurde mit Hilfe des PCR Cyclers GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, USA) zum Nachweis der verschiedenen BH3-only Gene durchgeführt.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz:

2 µl 10xPCR-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe); 2 µl MgCl₂ (50 mM); 1,6 µl dNTPs (2,5 mM); 0,5 µl Primer forward (10 µM); 0,5 µl Primer reverse (10 µM); 0,6 µl FAM-TAMRA-Sonde (5 µM); 0,2 µl R0x (100 µM); 0,2 µl Platinum-Taq (Invitrogen, Karlsruhe); 1 µl cDNA; ad 20 µl DEPC-H₂O

Programmprofil: 95 °C 4 min
95 °C 15 s }
62 °C 30 s } 50 Zyklen (G6PDH bei 64 °C)

Von allen Proben werden, ausgehend von einer cDNA, drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgt durch die relative Quantifizierung gegen ein Referenz-Gen, dessen mRNA-Expression möglichst wenig schwankt. Hierzu wurden die Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH) oder c-Abl verwendet. Die Berechnung erfolgte nach der delta-delta-CT-Methode. Die Messwerte wurden gemittelt und die Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt.

4.1.10 Klonierung von pcDNA3.1-Noxa_S und pcDNA3.1-Noxa_L

Die humane Noxa_S cDNA wurde freundlicherweise von Frank Essmann (Institut für Molekulare Medizin, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf; cDNA Sequenz unter www.ncbi.nlm.nih.gov, Nucleotide Accession No. D90070) zur Verfügung gestellt. Die humane Noxa_L cDNA wurde als „full length cDNA-Klon“ von der Firma ImaGenes (Berlin) mit der Bestellnummer IRATp970F0255D bezogen.

In der PCR werden spezifische DNA-Fragmente, die durch die in der Reaktion verwendeten 5'- und 3'-Primer festgelegt sind, mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert. Die PCR besteht aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Die Denaturierung erfolgt in der Regel bei 94 °C, dabei trennen sich die Stränge der Template-DNA. Anschließend wird das Reaktionsgemisch bis zu derjenigen Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch mit den zu amplifizierenden einzelsträngigen DNA-Fragmenten hybridisieren. Danach wird der Reaktionsansatz auf 72 °C erhitzt, das Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq), wobei in Gegenwart von Mg²⁺ der Primer verlängert wird und wieder doppelsträngige DNA vorliegt. So wird in jedem Zyklus die Zahl der Template-DNAs verdoppelt.

Die humanen ORFs wurden mittels PCR amplifiziert, wobei Primer mit passenden Schnittstellen (5'Ende *Bam*HI und 3'Ende *Xba*I) an den Enden des ORF synthetisiert und verwendet wurden. Die Schnittstellen wurden so gewählt, dass sich der ORF nach der Klonierung in richtiger Orientierung im Vektor befindet (siehe Kapitel 4.1.2). Somit wurden die cDNAs als *Bam*HI-*Xba*I Fragment in pcDNA3.1 kloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden durch Restriktionsspaltungen und Sequenzierung kontrolliert und anschließend amplifiziert.

4.1.11 Konstruktion von Adenoviren

Die Methode zur Konstruktion rekombinanter, replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren wurde nach dem modifizierten Protokoll von Chartier durchgeführt [Chartier et al., 1996].

Zur Erzeugung rekombinanter Adenoviren wurde der ORF des zu exprimierenden Proteins zunächst in das Shuttleplasmid kloniert. Dieses enthält neben einem CMV-minimalen-Promotor (enthält zusätzlich sieben

repetitive Bindungsdomänen (Tet-O(7)) für die Bindung des Transaktivators tTA), einer „multiple cloning site“ und einer Polyadenylierungssequenz, eine komplette Expressionskassette für die induzierbare Expression von rekombinanten Proteinen. Zusätzlich befinden sich auf dem Shuttlevektor virale Sequenzen, welche die homologe Rekombination mit einem adenoviralen Plasmid ermöglichen. Im nächsten Schritt erfolgt die homologe Rekombination zwischen überlappenden homologen Sequenzen des adenoviralen Plasmids und des Transfervektors *in vivo* in Bakterien. Dazu wurden das adenovirale Plasmid pAd-Del.1.3+tTA und das linearisierte Shuttleplasmid in *E.coli* Zellen BJ5183 kotransformiert. Der Vektor pAd-Del.1.3+tTA ist ein 33,4 kb großes Plasmid und enthält das Adenovirus Serotyp5 Genom mit Deletion der E1- und E3-Regionen. Die E3-Region wurde durch eine tTA-Expressionskassette ersetzt (siehe Kapitel 4.1.11.1) [Gillissen et al., 2003]. Im Gegensatz zur E3-Region des adenoviralen Genoms, ist die E1-Region für die Adenovirusreplikation essentiell. Die E1-Funktionen können durch HEK293 Zellen *in trans* komplementiert werden [Graham et al., 1977]. Die HEK293 Zelllinie enthält die viralen Gene E1A und E1B. Der für die homologe Rekombination verwendete *E.coli* Stamm BJ5183 besitzt Enzyme, welche die homologe Rekombination ermöglichen. Das nach der homologen Rekombination entstandene rekombinante adenovirale Plasmid enthält die Expressionskassette in der E1-Region und wird zur Generierung von rekombinanten Adenoviren in HEK293 Zellen transfiziert.

4.1.11.1 Klonierung des Plasmids pAd-Del.1.3+tTA

Um die tTA-Expressionskassette in das adenovirale Genom zu integrieren, wurde die tTA-Expressionskassette aus dem pTet-off Plasmid (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) über das *XhoI*–*PvuII* Fragment in den Vektor pAd3 kloniert, ein adenoviraler Shuttlevektor für die E3-Region. Im nächsten Schritt erfolgt die homologe Rekombination zwischen überlappenden homologen Sequenzen des adenoviralen Shuttlevektors und dem adenoviralem Plasmid pAd1 *in vivo* in *E.coli* Zellen BJ5183 RecBC-sbcB. Dabei entsteht das Plasmid pAd-Del.1.3+tTA [Gillissen et al., 2003].

4.1.11.2 Klonierung der Shuttleplasmide

Die Plasmide pcDNA3.1-Noxa_S und pcDNA3.1-Noxa_L wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I nach Angaben des Enzymherstellers gespalten. Der Reaktionsansatz wurde elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und das Noxa_S enthaltende *Bam*HI–*Xba*I Fragment ausgeschnitten. Die Gelextraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Ligation des Noxa_S enthaltenden *Bam*HI–*Xba*I Fragments in den adenoviralen Shuttle-Vektor pAd2-TRE, wurden die Schnittstellen der Enzyme *Bam*HI und *Xba*I verwendet. Bei dem Shuttleplasmid pAd2-TRE handelt es sich um ein „left end shuttle-Plasmid“, das zur Insertion von Genen in die E1-Region des Genoms von Adenoviren des Typs 5 dient. Es enthält 2,6 kb des linken Endes des Adenovirus Genotyp 5 mit einer 3,2 kb großen Deletion in der E1-Region. Diese größte mögliche E1-Deletion und die an ihrer Stelle eingesetzte „multiple cloning site“ entsprechen der von Bett et al. [Bett et al., 1994] für pΔE1sp1 beschriebenen Deletion. Durch Modifikationen von Gillissen et al. [Gillissen et al., 2003] enthält es ein TRE-Element (bestehend aus einem synthetischen P_{miniCMV}-Promoter, der zusätzlich sieben repetitive Bindungsdomänen (Tet-O(7)) für die Bindung des Transaktivators tTA enthält), ein N-terminales Myc-Tag und ein BGH-Polyadenylierungssignal.

Durch Restriktionsspaltungen wurde das entstandene Shuttleplasmid, welches nun eine TRE-Myc-Noxa_S bzw. TRE-Myc-Noxa_L-Expressionskassette enthält, kontrolliert und anschließend amplifiziert.

4.1.11.3 *Homologe Rekombination und Amplifikation der adenoviralen Plasmide*

Das Plasmid pAd-Del.1.3 enthält das adenovirale Genom des Adenovirus Serotyp 5, und wurde so weit modifiziert, dass die E3-Region durch eine Expressionskassette für den unter der Kontrolle eines CMV-Promoters stehenden tTA-Tet-off-Transaktivator ersetzt worden ist. Dadurch entstand das für die spätere homologe Rekombination eingesetzte Plasmid pAd-Del.1.3+tTA. Die inserierte tTA-Tet-off-Expressionskassette setzt sich aus dem P_{CMV} Promoter, tTA („Tetracycline-controlled Transactivator“) und dem Polyadenylierungssignal SV40polyA zusammen [Gillissen et al., 2003]. Im Gegensatz zu normalen Klonierungen, für die Bakterienstämme ohne die Fähigkeit zur Rekombination verwendet werden, kommen bei der Erzeugung des rekombinanten vollständigen Adenovirus Bakterien (*E.coli* BJ5183) mit dieser Eigenschaft zum Einsatz.

Das mit *PacI* und *NotI* geschnittene Shuttleplasmid wurde elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und das 4000bp-Fragment des Shuttleplasmids ausgeschnitten. Die Gelextraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die homologe Rekombination wurden 1 µg des über das Gel gereinigten 4000bp-Fragment des Shuttleplasmids mit 100 ng des mit *ClaI* geschnittenen und Gel gereinigten Plasmids pAd1-Del.1.3.-tTA mittels Elektroporation (siehe Kapitel 4.1.3.2) in elektrokompente *E.coli* BJ5183 Zellen kotransformiert und anschließend auf LB/Ampicillin (100 µg/ml) Platten ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden die kleinsten Einzelkolonien gepickt, in LB-Medium mit Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und zur Kontrolle mit Restriktionsenzymen gespalten. Das rekombinante Plasmid wurde in einem nachfolgenden Schritt in chemisch-kompetente *E.coli* DH5α Zellen retransformiert. Es erfolgte eine Maxipräparation der Plasmid-DNA (siehe Kapitel 4.1.4.2), welche zur Transfektion eingesetzt wurde.

4.1.12 Transfektion von HEK293 Zellen zur Produktion der rekombinanten Adenoviren

Der hier verwendete adenovirale Vektor ist in der E1-Region deletiert. Die E1-Region des adenoviralen Genoms kodiert für Gene zur Initiation der Replikation und deren Kontrolle, sowie den Schutz der viralen und zellulären DNA vor einem enzymatischen Abbau nach der Infektion, so dass zur Produktion von Viren eine Komplementierung dieser Region erfolgen muss. Dies erfolgt in trans durch die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293. Das nach der Rekombination entstandene Plasmid mit dem adenoviralen Genom enthält noch einen ca. 2000bp großen Anteil bakterieller Plasmid-DNA, der die Resistenz gegenüber dem Selektionsmarker beinhaltet. Um diesen zu entfernen, wurde das adenovirale Plasmid mit dem Enzym *PacI* verdaut, damit linearisiert und über Phenol-Chloroform extrahiert. Nach einer Ethanol-fällung wurde die DNA unter der Sterilwerkbank in sterilem Wasser aufgenommen. Die Transfektion der virusproduzierenden Zelllinie mit der adenoviralen DNA erfolgte durch Calcium-Phosphat-Copräzipitation (siehe Kapitel 4.2.5.1). Eingesetzt wurden ca. 10 µg des *PacI* verdauten adenoviralen Vektors pAd-tTa-Myc-Noxa_S bzw. pAd-tTa-Myc-Noxa_L. Die

Mischung wurde in unterschiedlichen Mengen auf am Vortag zu 70 % konfluent ausplattierte HEK293 Zellen gegeben. Nach Auftreten der ersten Plaques wurden die Zellen geerntet. Das Adenovirus wurde durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren aus den Zellen freigesetzt, wodurch das „Crude Virus Lysate“ (CVL) entsteht. Dazu wurde das Eppendorfgefäß zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37 °C im Wasserbad vollständig aufgetaut. Zellbestandteile wurden durch die Zentrifugation bei 10000 upm, 10 min, 4 °C entfernt. Das CVL wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.1.13 Adenovirusamplifikation

Die Virusamplifikation erfolgte durch erneute Infektion von HEK293 Zellen mit dem CVL, wobei zunächst eine 75cm²-Kulturflasche mit dem gewonnenen CVL infiziert wurde. Hierbei wurde das Medium einer ca. 80 % konfluenten Flasche mit HEK293 Zellen abgesaugt, das CVL auf die Zellen gegeben und die Flasche 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde den Zellen das gleiche Volumen an Kulturmedium mit 20 % FCS und 200 U/ml Penicillin, 0,2 µg/ml Streptomycin und 2 µg/ml Doxycyclin zugesetzt und die Zellen weiter bei 37 °C kultiviert. Bei deutlichem zytopathischen Effekt (CPE, dem Abrunden und Ablösen infizierter Zellen) wurden die Zellen geerntet und bei 1500 upm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Aus den Zellen wurde wieder das CVL gewonnen. Für die weitere Expansion des Virus wurden HEK293 Zellen in 36 150 cm²-Kulturflaschen zu 80 % Konfluenz ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Infektionsmedium überschichtet. Das Infektionsmedium setzt sich aus dem CVL (75 cm²-Kulturflasche) und dem jeweiligen Kulturmedium ohne den Zusatz von FCS oder Antibiotika zusammen. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37 °C wurde den Zellen das gleiche Volumen an Kulturmedium mit 20 % FCS und 200 U/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin und 2 µg/ml Doxycyclin zugesetzt. Bei deutlichem CPE wurden die Zellen geerntet und pelletiert. Der Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 20 ml abgesaugt und der verbleibende Rest bei -20 °C bis zur Aufreinigung gelagert.

4.1.14 Virusreinigung über Cäsiumchlorid-Gradienten

Das CVL wurde aus den Zellen durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren gewonnen. Um aus dem CVL reines Virus zu gewinnen wird dieses von Zellbestandteilen und anderen Proteinen mit Hilfe einer Ultrazentrifugation gereinigt. Das geschieht über einen Cäsiumchlorid (CsCl)-Stufengradienten.

Zum Aufbau des ersten CsCl-Stufengradienten wurden 2,5 ml CsCl 1,25 g/ml in ein Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen (Beckman) pipettiert und anschließend mit 2,5 ml CsCl 1,5 g/ml unterschichtet. Dieser CsCl-Gradient wurde dann vorsichtig mit 7 ml des CVL überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte in der Ultrazentrifuge LE-80K (Beckman) bei 30000 g, 21 °C für 2 Stunden im SW40 Rotor (Beckman). Nach der Zentrifugation wurde die Virusbande mit einer 1 ml Spritze und Luerlock-Kanüle (0,55 x 25 mm) abgezogen. Zur weiteren Aufreinigung wurde ein zweiter CsCl-Gradient aufgebaut. Das aufgefangene Virus wurde mit CsCl 1,35 g/ml auf 3 ml aufgefüllt und mit 3 ml CsCl 1,5 g/ml gemischt. Nach dem Überführen in ein Ultra-Clear-Zentrifugenröhrchen (Beckman) wurde zunächst mit 3 ml CsCl 1,35 g/ml und anschließend mit 3 ml CsCl 1,25 g/ml überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte über Nacht (mindestens 16 Stunden) in der Ultrazentrifuge LE-80K (Beckman) bei 30000 g, 21 °C im SW40 Rotor (Beckman). Die Virusbande wurde mit einer Insulinspritze und Luer-Lock-kanüle abgezogen und das Virus bis zur Säulenreinigung auf Eis gelagert.

CsCl, Dichte 1,25 g/ml:	26,99 g CsCl und 73,01 ml Aqua ad injectabile, sterilfiltriert
CsCl, Dichte 1,35 g/ml:	35,18 g CsCl und 64,82 ml Aqua ad injectabile, sterilfiltriert
CsCl, Dichte 1,5 g/ml:	45,41 g CsCl und 54,59 ml Aqua ad injectabile, sterilfiltriert

4.1.15 Säulenreinigung

Um das aufgereinigte Virus von CsCl Rückständen zu befreien, führt man eine Gelfiltration über eine NAP-25-Säule durch.

Auf eine NAP25-Säule (Pharmacia Biotech) wurden zum Waschen 4x 5 ml Adenosuspensionspuffer pipettiert und anschließend 1 ml des Virus auf die Säule gegeben. Es wurde dann nochmals 1,5 ml Adenosuspensionspuffer auf die Säule gegeben. Wenn 1,5 ml durchgetropft waren, wurde ein neues steriles Röhrchen unter die Säule geschoben und 2 ml Adenosuspensionspuffer auf die Säule pipettiert. Die gereinigten Viren wurden mit den nächsten Tropfen aufgefangen und in 50 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

Adenosuspensionspuffer: 851 ml Millipore-Wasser, 135 ml 1 M NaCl, 3 ml 1 M KCl, 1 ml 1 M MgCl₂, 10 ml 1 M Tris-HCl, 10 % Glycerin, Sterilfiltration

4.1.16 Test auf replikationskompetente Viren mittels PCR

Rekombinante Adenoviren sind E1A und E3 deletiert, da sie die tTA-Expressionskassette in der E1A-Region und die Myc-Noxa γ -Expressionskassette in der E3-Region enthalten. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit replikationsdefizienten Adenoviren gearbeitet, um zu verhindern, dass der zytopathische Adenoviruseffekt durch Replikation hervorgerufen wird. Aus diesem Grund muss gewährleistet sein, dass es bei der Produktion in der Verpackungslinie HEK293 zu keiner unerwünschten Rekombination der E1A-Region gekommen ist. Dies wurde mittels PCR überprüft, wobei in für die Adenoviren kein E1A nachgewiesen werden darf. Als Positivkontrolle wurden Ansätze für Fragmente der E4-Region, die sowohl im rekombinanten als auch im Wildtyp Adenovirus Typ5 vorhanden sind, mitgeführt. Für die Gewinnung viraler DNA wurde die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion angewandt. Eingesetzt wurde 1 µl des aufgereinigten Virus. Durch Zugabe von 20 µl Proteinase K Mix und Inkubation von 60-120 min bei 55 °C wurde zunächst die Virushülle enzymatisch abgebaut und anschließend wurden dem Ansatz 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol pH 8,0 (Volumenverhältnisse 25/24/1) zugesetzt, gut geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 upm getrennt. Die obere, DNA-haltige, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, mit 300 µl Chloroform versetzt, erneut zentrifugiert und die DNA aus dem Überstand nach Standardmethoden gefällt. Die anschließende PCR und Gelelektrophorese wurden ebenfalls nach Standardbedingungen durchgeführt.

Für die Virusexperimente werden nur E1A-negativ getestete Adenoviren verwendet.

Proteinase K Mix: 5 mM EDTA, 20 mM Tris (pH 8,0), 2 % (v/v) SDS, 0,25 µg/µl Proteinase K

Reaktionsansatz (20 µl): 1 µl Vektorprobe bzw. H₂O als Negativkontrolle, 1x PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1 U Taq DNA-Polymerase, 500 nM Primer

PCR-Programmprofil (Noxa _L):	94 °C 5 Minuten
	94 °C 30 Sekunden]
	68 °C 30 Sekunden } 32 Zyklen
	72 °C 30 Sekunden]
	72 °C 7 Minuten, 4 °C halten

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von stabilen Transfektanten

Adhärente Zellen wurden in DMEM/high Glucose (4,5 g/l) Medium (komplementiert mit 10 % inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) im Brutschrank bei 37 °C, einer Atmosphäre von 5 % CO₂-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Kulturflaschen mit ventiliertem Deckel kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert. Die Zellen mussten zum Ablösen mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 5 min mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt werden. Bei allen Experimenten wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zellzahl und Vitalität der Zellen wurden mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau-Exklusion bestimmt. Dazu wurden die Zellen 1:10 mit Trypanblaulösung gemischt. Trypanblau ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, da es von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und den Nukleus und färbt diese Zellen blau.

Trypanblaulösung: 0.2 g Trypanblau in 100 ml Aqua dest. lösen und filtrieren.

4.2.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

1×10^7 Zellen wurden 5 min bei 1200 U/min, 4 °C pelletiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Zellkulturmedium ohne Zusätze resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml Einfriermedium langsam dazugegeben, gemischt und die Suspension auf 2 Einfrier Röhrchen verteilt. Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen in ein Röhrchen überführt und langsam in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen mit Kulturmedium zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert. Vor dem Einsatz in Experimenten wurden alle frisch aufgetauten Zellen mindestens zweimal passagiert.

Einfriermedium: 80 % FCS + 20 % DMSO (GIBCO, Karlsruhe)

4.2.4 Behandlung von Zellen mit Zytostatika, BH3-Mimetika oder Proteasominhibitoren

Adhärenente Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch (6-Loch-Schale) ausplattiert und am darauf folgenden Tag mit 10 µg/ml Cisplatin, 30 bzw. 50 µM Gossypol, HA14-1, BH3I-2' oder 0,1 bzw. 1 µM Bortezomib behandelt und bis zur Zellernte im Brutschrank inkubiert. Suspensionszellen wurden am Vortag 4×10^5 Zellen/ml ausgesät, um somit eine exponentielle Wachstumsphase zu ermöglichen. Am folgenden Tag wurden 3×10^5 Zellen pro Loch (6-Loch-Schale) ausgesät und sofort mit 12 oder 24 ng/ml Taxol, 30 bzw. 50 µM Gossypol, HA14-1, BH3I-2' oder 20 bzw. 200 ng/ml PMA behandelt und bis zur Zellernte im Brutschrank inkubiert.

4.2.5 Gentransfer in eukaryotische Zellen

4.2.5.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Eine der ältesten und weitverbreitesten Methoden zum Gentransfer ist die phagozytotische Aufnahme eines Kopräzipitats aus DNA und Calciumphosphat [Graham und van der Eb, 1973]. Hierbei werden DNA, Calcium und Phosphatpuffer gemischt. Dabei bildet sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der auf die Zellen pipettiert und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen wird. Obwohl die DNA in der Zelle in phagozytotischen Vesikeln vorliegt, gelangt ein Teil der DNA-Moleküle in den Zellkern, um dort transkribiert bzw. stabil in die DNA integriert zu werden. Für die Transfektion wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 25 µl Calciumchlorid-Puffer gemischt und auf 250 µl mit sterilem Aqua bidest. aufgefüllt. Unter ständigem Schütteln wurde das gleiche Volumen Transfektionspuffer zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Präzipitate bilden können. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise auf die am Vortag zu 70 % konfluent ausplattierten Zellen gegeben.

Transfektionspuffer:	275 mM NaCl, 1 mM KCl, 3 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM HEPES pH 6,75 steril filtrieren
CaCl ₂ -Puffer:	2,5 M CaCl ₂

4.2.5.2 Lipofektion

Lipofektion ist eine Transfektionsmethode, bei der die DNA als Teil eines Komplexes mit Lipopolyaminen in die eukaryotische Zelle gebracht wird [Felgner et al., 1987]. Lipopolyamine binden die DNA und bedecken sie mit einer kationischen Schicht. Gelangen diese Komplexe an die Zelloberfläche, fusionieren sie mit der Zellmembran oder werden durch Endozytose aufgenommen und transportieren so die DNA ins Zytoplasma. Dazu wurden die Reagenzien Lipofectamine 2000 (Molecular Probes) oder DharmaFect (Dharmacon) verwendet. Die Transfektion erfolgte wie vom Hersteller beschrieben.

4.2.6 Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren

Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Ausplattieren bei einer Konfluenz von ca. 70 % mit den rekombinanten Adenoviren infiziert. Dazu wurde das Virus in den angegebenen MOIs (multiplicity of infection; infektiöse

Viruspartikel pro Zelle) im entsprechenden Zellkulturmedium ohne FCS verdünnt. Dieses Infektionsmedium wurde auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Kontrollen wurden nur mit Serum-freiem Medium behandelt. Nach der Inkubation wurde die gleiche Menge an Medium mit 20 % FCS, 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin zugegeben. Aufgrund des adenoviralen TET-off Systems wurde dem Medium zusätzlich 2 µg/ml Doxycyclin zur Unterdrückung der Proteinexpression zugesetzt.

4.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie stellt ein optisches Meßsystem für einzelne Partikel mit fluoreszierenden Eigenschaften dar. Das FACScan-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) misst die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen in drei Fluoreszenzkanälen. Dazu werden Zellen mit spezifischen fluoreszierenden Reagenzien versetzt. Der Zellstrom wird in einer Pufferflüssigkeit in feine Tröpfchen verteilt, entlang einer laminaren Flüssigkeitsströmung in die Meßküvette transportiert und an einem Laserstrahl (Argon-Laser 488 nm, 15 mW) vorbeigeleitet. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laserstrahl angeregt und emittieren dadurch Licht charakteristischer Wellenlänge, welches vom Gerät detektiert wird und proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge ist. Die von den Halbleiterelementen aufgenommenen Lichtimpulse werden in Photomultipliern verstärkt und zur weiteren Auswertung an einen Auswertungscomputer übergeben. Das Gerät kann simultan mehrere Parameter messen: die Lichtstreuung im Strahlengang (Forward Scatter, FSC), seitlich zum Strahlengang (Side Scatter, SSC) und drei verschiedene Fluoreszenzkanäle (FL1= 537 nm, FL2= 597 nm, FL3= 650 nm). Der Forward Scatter misst entlang der Achse des einfallenden Lichtes und kann somit die Zellgröße detektieren. Der Side Scatter erfasst die seitliche Streuung bzw. Lichtbrechung und Reflektion der Zellen, die proportional der Granularität ist. Für die Auswertung werden die Messdaten in Histogrammen oder Punktwolkendiagrammen (Dot Plots) dargestellt.

4.3.1 Apoptosemessung

Die im Zuge der Apoptose auftretende DNA-Fragmentierung kann eingesetzt werden, um Apoptose durchflusszytometrisch zu detektieren. Die Permeabilisierung und Fixierung der Zellen mit Formaldehyd und Ethanol ermöglicht das Eindringen von Propidiumjodid (PI) in den Zellkern. Da PI in die DNA interkaliert, kann die Fluoreszenzintensität von PI als Maß für den DNA-Gehalt der Zellen dienen. Apoptotische Zellkerne zeigen einen geringeren DNA-Gehalt als Kontrollzellen und stellen sich nach der Färbung der zellulären DNA als hypodiploid dar. Die Zellen wurden nach Behandlung oder Virusinfektion abtrypsiniert, in eine Microtiterplatte überführt und mit 200 µl PBS/2 % (v/v) Formaldehyd für 30 min auf Eis fixiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1200 upm wurde der Überstand abgesaugt, die Zellpellets resuspendiert und mit 70 % Ethanol/PBS (v/v) 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen für 5 min bei 1200 upm zentrifugiert, der Überstand entfernt, 50 µl RNase-Lösung zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellpellets in 200 µl PI-Lösung resuspendiert. Die Apoptose wurde auf Einzelzellniveau durch Bestimmung des DNA-Gehaltes einzelner Zellen am FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson) gemessen. Der zelluläre DNA-Gehalt wurde dabei mit logarithmischer Einstellung im FL-3 Kanal des FACS-Gerätes gemessen. Die FACS-Daten wurden mit der Cell Quest Software für Apple-Macintosh OSX ausgewertet.

RNase-Lösung:	40 µg/ml DNase-free RNase A in PBS
PI-Lösung:	50 µg/ml PI in PBS

4.3.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (JC-1 Assay)

Das Membranpotential der Mitochondrien resultiert aus der asymmetrischen Verteilung von Protonen und anderer Ionen auf beiden Seiten der inneren Mitochondrienmembran. Dieser elektrochemische Gradient besteht aus zwei Komponenten: dem Membranpotential und dem pH Gradienten. Der größte Teil der Energie des Protonengradienten entspricht dem Membranpotential. Aufgrund der negativen elektrischen Ladung auf der inneren Seite der inneren Mitochondrienmembran können sich kationische lipophile Fluorochrome (z.B. JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in der Mitochondrienmatrix akkumulieren und entsprechend der Nernst'-Gleichung verteilen. Die Bildung von Aggregaten aus diesen Farbstoff-Monomeren verursacht u.a. veränderte Absorptions- und Fluoreszenzspektren. JC-1 bildet sogenannte J-Aggregate, wobei das Fluoreszenzmaximum einen Shift von 537 nm (Monomer, grüne Bande) zu 597 nm (J-Aggregate, rote Bande) zeigt. Es existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz durch J-Aggregatbildung und dem Anstieg des Membranpotentials. Dies bedeutet, dass im Zuge der Apoptose, wenn das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht, eine Abnahme der J-Aggregate im Vergleich zu Kontrollzellen nachweisbar ist, d.h. die Rotfluoreszenz nimmt ab und die Grünfluoreszenz nimmt zu.

Die durchflusszytometrische Messung des mitochondrialen Membranpotentials in intakten Zellen ermöglicht die Analyse von Potentialveränderungen auf Einzelzellniveau. Die Zellen wurden trypsiniert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml JC-1-Lösung versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert (Suspensionszellen 1 ml JC-1-Lösung; 30 min Inkubation), 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen. Dann wurde die Fluoreszenz der Zellen am FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson; Heidelberg) im FL-2-Kanal (roter Kanal) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Cell Quest Software und die Zellen mit niedrigerem Membranpotential wurden in % angegeben.

JC-1-Lösung:	adhärente Zellen: 10 µg/ml JC-1 in PBS
	Suspensionszellen: 2 µg/ml JC-1 in PBS

4.3.3 Messung der Caspaseaktivität

Die Aktivierung von Caspasen ist ein typisches Kennzeichen der Apoptose. Die Erfassung aktivierter Caspasen ermöglicht somit auch die Erfassung apoptotischer Zellen. Fluorochrom-Inhibitoren von Caspasen (Carboxyfluorescein FLICA Apoptosis Detection Kit; Axxora, Lausen, Schweiz) sind zellpermeabel und nicht zytotoxisch. Sie binden innerhalb der Zelle kovalent an den reaktiven Cysteinrest im aktiven Zentrum der großen Untereinheit des aktiven Caspaseheterodimers und inhibieren somit jede weitere enzymatische Aktivität. Ungebundene Fluorochrom-Inhibitoren der Caspasen diffundieren wieder aus den Zellen und werden ausgewaschen.

Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit dem fluoreszenzmarkierten Inhibitor bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen, in 100 µl Waschpuffer aufgenommen und am FACScan Durchflusszytometer im FL-1 Kanal gemessen. Somit entspricht die Zunahme der Fluoreszenzintensität im FL-1 Kanal (grüner Kanal) einer Zunahme von kovalent gebundenen fluoreszenzmarkierten Caspaseinhibitoren in Zellen. Die Auswertung erfolgte mit der Cell Quest Software und die Zellen mit Caspaseaktivität wurden in % der angefärbten Zellen angegeben.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteinpräparation

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und je nach Versuchsansatz behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, pelletiert und in 20-100 µl Lysepuffer 30 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 15000 upm (Zentrifuge 5415C Eppendorf, Hamburg) und 4 °C entfernt. Die Zelllysate wurden entweder sofort bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 270 mM Saccharose, 1 % Triton X-100, 1 Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Pierce

Als Grundlage dieser Konzentrationsbestimmung dient die Reaktion von Proteinen mit alkalischem Cu^{2+} zu Cu^{1+} (Biuret-Reaktion). Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) bildet in alkalischem Medium einen 2:1 Komplex mit Cu^{1+} -Ionen. Dabei entsteht ein stabiles rotes Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. In einer Microtiterplatte wurden 10 µl Proteinextrakt mit 200 µl Arbeitslösung (Reagenz A : Reagenz B, 50 : 1) 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 620 nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Konzentrationsreihe mit Endkonzentrationen von 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4 und 8 mg/ml. Duplikate wurden gemessen und daraus eine Eichgerade erstellt, welche die Ermittlung der Probenkonzentrationen ermöglichte.

Reagenz A: 1 % BCA-Na_2 ; 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-H}_2\text{O}$; 0,16 % Na_2 Tartrat; 0,4 % NaOH, 0,95 % NaHCO_3 ; pH 11,25

Reagenz B: 4 % $\text{CuSO}_4\text{-5H}_2\text{O}$

4.4.3 Westernblotanalyse

Der Westernblot ist eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei werden die Proteine zunächst mittels Gelelektrophorese, abhängig von ihrer Größe aufgetrennt und danach im elektrischen Feld auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran können Proteine durch eine spezifische Antikörperreaktion detektiert und mit einer Enzymreaktion (ECL) sichtbar gemacht werden.

4.4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinproben werden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt. Hierbei werden die Proteine zunächst mit Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionischem Detergenz in der Gegenwart von β -Mercaptoethanol als reduzierendem Agens denaturiert. Das negativ geladene SDS interkaliert zwischen aliphatische Aminosäurereste und umgibt dabei die Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe bzw. ihrer Kettenlänge mit einer negativ geladenen Hülle. Die Proteine dissoziieren in ihre Untereinheiten und die einzelnen Polypeptidketten entfalten sich vollständig. Die räumliche Gestalt und die ursprüngliche Nettoladung der Proteine haben somit keinen Einfluss mehr auf die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Das Molekulargewicht ist der einzige bestimmende Parameter. Mit diesem Verfahren können Polypeptidketten getrennt werden, die sich in ihrem Molekulargewicht um weniger als 10 % unterscheiden. Die Proteine wandern im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, die aus einem Gemisch von Acrylamid und Bisacrylamid gebildet wird. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, die durch Bisacrylamid vernetzen. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) wirkt hierbei als Katalysator und APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalbildner. Um eine schärfere Trennung der Proteine zu erreichen, wird über das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Die SDS-PAGE wird in einem diskontinuierlichen System aus Trenn- und Sammelgel bezüglich Acrylamidkonzentration, Pufferzusammensetzung und -konzentration, pH-Wert durchgeführt, um eine maximale Auflösung und Trennschärfe zu erzielen. Das Molekulargewicht der Proteine wird durch Vergleich ihrer Wanderungsstrecke mit denen von Standardproteinen ermittelt.

Gereinigte Glasplatten wurden mit Abstandshaltern in eine Gießapparatur eingespannt. Das Trenngel wurde bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Gele wurden in die Vertikallaufkammer eingespannt und die Kammer mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proteine wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und nach Abkühlung wurden 20 µg Protein pro Gel-Tasche aufgetragen. Neben den Proteinproben wurde ein Größenstandard (Rainbowmarker, Amersham) aufgetragen, um die nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden zu ermöglichen. Die Trennung erfolgte in 10 % oder 14 % Polyacrylamid-Gelen (0,75 mm) und einer ca. 1,5 cm großen Schicht 5 % Sammelgel für 10 min bei 120V und anschließend für ca. 60 min bei 180V.

5x Probenpuffer: 300 mM TrisHCl (pH 6,8), 3 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 2 % SDS, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Laufpuffer (10x): 250 mM Tris , 2 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3

Sammelgel (5 %; für 2 Gele): 0,375 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 % Lösung), 0,38 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 , 30 µl 10 % SDS, 30 µl 10 % APS, 3 µl TEMED, 2,185 ml H₂O

Trenngel (10 %; für 2 Gele): 2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 % Lösung), 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 , 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % APS, 4 µl TEMED; 4,8 ml H₂O

Trenngel (14 %; für 2 Gele): 3,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 % Lösung), 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % APS, 4 µl TEMED; 3,8 ml H₂O

4.4.3.2 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Um die getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen die Proteine aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Der Transfer von Molekülen auf die Oberfläche einer immobilisierenden Nitrocellulosemembran ermöglicht den Nachweis von elektrophoretisch getrennten Proteinen mittels diverser immunologischer Tests, Proteinsequenzierung oder Aminosäureanalyse. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese mit einer senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegten Spannung auf eine 0,2/0,45 µm Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell; Dassel) transferiert, von der die meisten Proteine auf Grund hydrophober Wechselwirkungskräfte fest gebunden werden. Der Transfer der Proteine wurde mit einer Blotting-Apparatur (BioRad; München, Deutschland) in 60 min bei 1 mA/cm² Membran nach dem Semi-dry-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurden Gel und Membran sandwichartig von Filterpapieren eingerahmt, die als Ionenreservoir dienten. Von der Anode zur Katode wurde das Sandwich folgendermaßen aufgebaut: 2 Lagen mit 1x Blot-Puffer äquilibriertes Filterpapier (2 mm), Nitrocellulosemembran (mit 1x Blot-Puffer äquilibriert), SDS-Gel, 2 Lagen 1x Blot-Puffer äquilibriertes Filterpapier. Nach jeder Lage wurden die Luftblasen sowie überschüssiger Puffer entfernt. Der Transfer der Proteine wurde mit einer Ponceau S-Färbung kontrolliert.

Blot-Puffer: 10 mM 3-(Cyclohexylamino) Propan-1-Sulphonsäure (pH 11, CAPS);
10 % Methanol

Ponceau S-Färbelösung: 5 %ige Essigsäure; 0,1 % Ponceau S

4.4.3.3 Immunodetektion transferierter Proteine

Das Prinzip des ECL-Westernblots beruht auf der Bindung eines spezifischen ersten Antikörpers an die Membran-gebundenen Proteine, an den im nächsten Schritt ein Peroxidase-gekoppelter zweiter Antikörper bindet. Das ECL-System nutzt die Peroxidase/Wasserstoffperoxid katalysierte Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen. Nach der Oxidation befindet sich Luminol im angeregten Zustand und die Chemilumineszenz beim Abfall auf den Grundzustand kann mittels Autoradiografie detektiert werden. Enhancer, wie z.B. Phenole verstärken das Licht bis zu 1000-fach und verlängern die Emission. Die maximale Lichtemission ist bei einer Wellenlänge von 428 nm messbar. Die jeweiligen Antikörperversdünnungen wurden entsprechend den Firmenbeschreibungen in Blocklösung hergestellt. Die Nitrocellulosemembran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) in Blocklösung geschüttelt, anschließend mit PBST abgespült und nacheinander die jeweiligen verdünnten Antikörper zugegeben. Nach jeder Inkubationszeit eines Antikörpers (primärer Antikörper über Nacht bei 4 °C, sekundärer Peroxidase-gekoppelter Antikörper 1 Stunde bei RT) wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBST für 5 min auf dem Schüttler entfernt. Zur Detektion wurde das ECL-Westernblotting Reagenz verwendet. Dazu wurde die Membran 1 min mit den ECL-Lösungen behandelt und das Chemilumineszenzsignal der detektierten Proteinbanden mittels Autoradiographie auf einem Hyperfilm (Amersham-Buchler; Braunschweig) sichtbar gemacht.

Blocklösung	10 % Blockingreagenz (Roche); 1x PBS; 0,05 % Tween20
Antikörperlösung:	1x PBS; 0,05 % Tween 20; Antikörper in entsprechender Verdünnung; 0,001 % Natriumazide
PBST:	1x PBS; 0,1 % Tween 20

4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für den Nachweis exogen exprimierten Noxa_L-Proteins mittels Immunfluoreszenz wurde die Zelllinie HeLa verwendet. $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch wurden auf runden Deckgläschen in 12-Loch-Platten kultiviert und nach 24 Stunden mit 25 MOI AdNoxa_L infiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3 % frischem Paraformaldehyd für 15 min auf Eis fixiert. Die Permeabilisierung wurde mit 0,5 % Triton X-100 in PBS für 2 min durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % FCS in PBS für 30 min bei RT. Es folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern gerichtet gegen Myc und Tom20 (in 5 % FCS in PBS) über Nacht bei 4 °C, dreimaliges Waschen mit PBS und die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (in 5 % FCS in PBS) für 1 Stunde bei RT. Nach 2 minütiger Inkubation mit Höchst 33258 (1:1000 in PBS verdünnt) und zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Filterpapier abgetropft und mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen „Fluorescent Mounting Media“ auf Objektträger überführt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Die mikroskopische Auswertung der Präparate wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Leica TC_S SP5 Tandem; Leica, Wetzlar) bei einer 630-fachen Vergrößerung unter Ölimmersion, durchgeführt. Dabei wird, anders als bei der Lichtmikroskopie, sowohl das von der Laserquelle ausgehende, als auch das vom Präparat emittierte Licht in sog. „confocal pinholes“ fokussiert. Dadurch werden andere Lichtquellen seitens der Umgebung und des Präparates bei der Errechnung des endgültigen Bildes nicht berücksichtigt. Zum Erhalt eines zweidimensionalen Bildes wird das Präparat in einer Ebene gescannt. Die einzelnen Bilder für die unterschiedlich fluoreszierenden Antikörper wurden am Computer zu einer zweifarbigen Darstellung zusammengeführt.

DU145 EGFP-Bak und DU145 EGFP-Bax Zellen wurden wie HeLa Zellen ausplattiert und infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in 3 % Paraformaldehyd 15 min fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Tropfen „Fluorescent Mounting Media“ auf Objektträger überführt. Die mikroskopischen Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M; Zeiss, Göttingen) bei 400-facher Vergrößerung und der Software OpenLab 5.0 (Improvision, Tübingen) ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 BH3-Mimetika induzieren Zelltod in Krebszellen

5.1.1 Charakterisierung der Zellsysteme

Krebszelllinien werden gern als Modellsysteme für die Untersuchung verschiedener zellbiologischer Zusammenhänge verwendet. Um den Einfluss von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern auf Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2-induzierte Apoptose untersuchen zu können, wurden neben Jurkat Zellen (humane T-Zellen einer akuten lymphoblastischen Leukämie), BJAB Zellen (humane Burkitt-ähnliche Lymphomzellen) auch HCT116 Zellen (Kolonkarzinomzellen) verwendet. Es wurden stabile Transfektanten der Jurkat Zelllinie benutzt, die mit einem Leervektor (pBabepuro, mock) bzw. mit dem dazugehörigen Bcl-x_L-Expressionsvektor (pBabeBcl-x_L, Bcl-x_L) transfiziert waren. Jurkat Bcl-x_L Zellen exprimierten stark Bcl-x_L, wohingegen in Jurkat mock Zellen keine Bcl-x_L-Expression nachweisbar war (Abb. 8). Auch BJAB Zellen wurden stabil mit einem Leervektor (mock) bzw. dem Bcl-x_L-Expressionsvektor (Bcl-x_L) transfiziert [Fulda et al., 2001]. Abb. 8 zeigt eine starke Überexpression von Bcl-x_L in BJAB Bcl-x_L Zellen im Vergleich zu BJAB mock Zellen. Als drittes Modellsystem wurde eine humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116, stabil transfiziert mit Leervektor (pIRESneo3, mock), Bcl-2-Expressionsvektor (pIRESneo3-Bcl-2, Bcl-2) bzw. Bcl-x_L-Expressionsvektor (pIRESneo3-Bcl-x_L, Bcl-x_L), verwendet. Die Überexpression von Bcl-x_L und Bcl-2 in den HCT116 Transfektanten ist in Abb. 8 gezeigt.

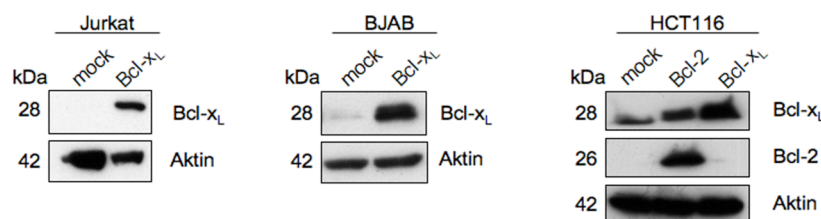


Abb. 8: Proteinexpressionsstatus von Bcl-x_L und Bcl-2 in verwendeten Zellsystemen

Proteinexpressionsstatus von Bcl-x_L und Bcl-2 in mock- (Vektorkontrolle) und Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-Transfektanten verschiedener Zelllinien. Aktin diente als Ladekontrolle.

Um die Funktionalität der verschiedenen Zellsysteme zu überprüfen, wurden diese mit den Zytostatika Taxol bzw. Cisplatin behandelt. Taxol, auch Paclitaxel genannt, wurde ursprünglich aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert und gehört in die Gruppe der Taxane. Es hemmt den Abbau von Mikrotubuli, welche ein essentieller Bestandteil der Mitosespindel sind, und blockiert somit sich teilende Zellen [Jordan und Kamath, 2007]. Cisplatin enthält ein komplex gebundenes Platinatom und wirkt, ähnlich wie bifunktionelle Alkylantien, durch die Quervernetzung von DNA-Molekülen, wodurch DNA-Schäden induziert werden [Barabas et al., 2008]. Taxol und Cisplatin sind in der Chemotherapie maligner Tumoren eingesetzte Zytostatika, welche den intrinsischen Apoptoseweg aktivieren, der von Bcl-2 Proteinen kontrolliert wird [Wieder et al., 2001]. Die Überexpression von anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern sollte zur Hemmung der Apoptose führen. Jurkat mock und Jurkat Bcl-x_L Zellen wurden mit 12 ng/ml Taxol behandelt und der nukleäre DNA-Gehalt der Zellen nach 72 Stunden auf Einzelzellniveau durch eine modifizierte Zellzyklusanalyse gemessen. Der nukleäre DNA-Gehalt ist in apoptotischen Zellen durch die Fragmentierung der genomischen DNA herabgesetzt und resultiert in einem Apoptose-charakteristischen hypodiploiden DNA-Gehalt der Zellen im Vergleich zu nicht

behandelten Zellen. Unbehandelte Jurkat mock und Bcl-x_L Zellen wiesen eine geringe Grundapoptose auf. Im Gegensatz dazu zeigten nach Behandlung mit Taxol ca. 65 % der Jurkat mock Zellen einen hypodiploiden DNA-Gehalt (Abb. 9A). Aber nur ca. 35 % der Bcl-x_L-überexprimierenden Jurkat Zellen wiesen fragmentierte DNA auf (Abb. 9A). Taxol induzierte Apoptose in Jurkat Zellen, die durch die Überexpression von Bcl-x_L gehemmt wurde. Nach 72-stündiger Kultivierung der BJAB mock und Bcl-x_L Zellen blieb die Apoptoserate der Kontrollkulturen im für Zellkulturbedingungen normalen Bereich. Die Behandlung mit Taxol resultierte in ca. 75 % der BJAB mock Zellen in DNA-Fragmentierung (Abb. 9B). Die Taxol-induzierte Apoptose wurde hingegen im Vergleich zu BJAB mock Zellen in Bcl-x_L-überexprimierenden BJAB Zellen (ca. 25 % hypodiploide Zellen) deutlich gehemmt. Mit 10 µg/ml Cisplatin behandelte HCT116 Kolonkarzinomzellen zeigten in ca. 70 % der mock transfizierten Zellen fragmentierte DNA (Abb. 9C). Hingegen wiesen nur ca. 30 % der Bcl-x_L-überexprimierenden Zellen und ca. 27 % der Bcl-2-overexprimierenden Zellen fragmentierte DNA auf. Die Überexpression von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 in HCT116 Zellen hemmte also die Cisplatin-induzierte Apoptose. Man kann alles in allem feststellen, dass die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen in den verwendeten Zellsystemen den Zytostatika-induzierten Zelltod hemmt und die überexprimierten Proteine funktionell sind. Somit sind diese Zellsysteme für die weiteren Versuche geeignet.

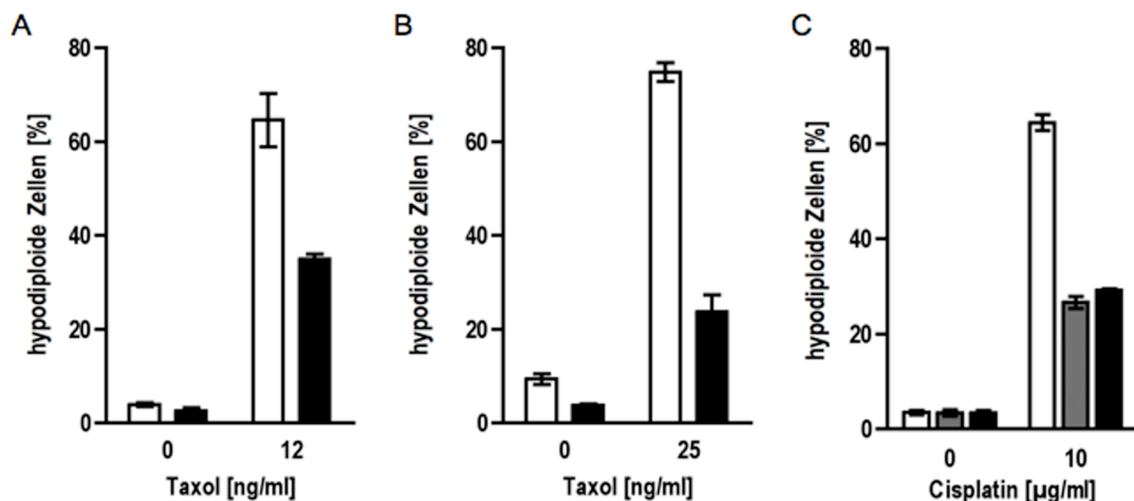


Abb. 9: Überexpression von Bcl-x_L und Bcl-2 hemmt den Zytostatika-induzierten Zelltod in Jurkat, BJAB und HCT116 Zellen

Nach 72-stündiger Inkubation wurde der nukleäre DNA-Gehalt der Zellen auf Einzelzellniveau mittels Durchflusszytometrie gemessen. Hypodiploide Zellen sind in % dargestellt und entsprechen der Apoptoserate. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

A Jurkat mock (weiße Balken) und Jurkat Bcl-x_L (schwarze Balken) Zellen wurden mit 12 ng/ml Taxol behandelt. B BJAB mock (weiße Balken) und BJAB Bcl-x_L (schwarze Balken) Zellen wurden mit 25 ng/ml Taxol behandelt. C HCT116 mock (weiße Balken), HCT116 Bcl-2 (graue Balken) und HCT116 Bcl-x_L (schwarze Balken) Zellen wurden mit 10 µg/ml Cisplatin inkubiert.

5.1.2 BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig vom Bcl-2- und Bcl-x_L-Expressionsstatus

Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' sind kleine, natürliche, organische Substanzen, welche anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder binden und hemmen [Degterev et al., 2001; Kitada et al., 2003; Wang et al., 2000]. Sie werden auch BH3-Mimetika genannt, da sie in die hydrophobe Tasche der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine

binden und deshalb wie BH3-only Proteine wirken sollen. Um zu untersuchen ob diese Substanzen wie BH3-only Proteine bzw. als Bcl-2 Inhibitoren wirken, wurden die bereits vorgestellten, geeigneten Zellsysteme verwendet.

Unbehandelte Jurkat mock und Jurkat Bcl-x_L Zellen wiesen nur eine geringe Grundapoptoserate auf, wohingegen die Behandlung dieser Zellen mit Gossypol zur dosisabhängigen Induktion von hypodiploiden Zellen führte (Abb. 10A). Eine Behandlung mit 50 µM Gossypol führte sowohl in Jurkat mock als auch in Jurkat Bcl-x_L Transfektanten zu 50-60 % apoptotischen Zellen. Überraschenderweise hemmte die Überexpression von Bcl-x_L die Gossypol-induzierte Apoptose kaum. Gossypol induzierte zudem auch in BJAB mock und BJAB Bcl-x_L Zellen sowie in HCT116 mock und HCT116 Bcl-x_L Zellen Apoptose (Abb. 10B, C). Die detektierte Apoptoserate war unabhängig vom Bcl-x_L-Expressionsstatus, somit konnte die Überexpression von Bcl-x_L die Gossypol-induzierte Apoptose auch in diesen Zellsystemen kaum hemmen. Bcl-2 ist ein weiteres Protein der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie, welches Apoptose hemmt. Um zu überprüfen, ob die Gossypol-induzierte Apoptose nicht nur unabhängig von Bcl-x_L, sondern auch unabhängig von Bcl-2 erfolgt, wurden HCT116 Bcl-2 Zellen untersucht. Im Vergleich zu HCT116 mock Zellen blockierte die Überexpression von Bcl-2 die Gossypol-induzierte Apoptose ebenfalls nicht wesentlich (Abb. 10C).

Nicht nur ca. 68 % der Jurkat mock, sondern auch ca. 55 % der Jurkat Bcl-x_L Zellen wiesen nach Behandlung mit dem BH3-Mimetikum HA14-1 (50 µM) einen hypodiploiden DNA-Gehalt auf (Abb. 10A). Auch ca. 73 % der BJAB mock und BJAB Bcl-x_L Zellen zeigten nach einer Inkubation mit 30 µM HA14-1 Apoptose (Abb. 10B). Ebenso zeigten nach der Behandlung mit 50 µM HA14-1 35-40 % der HCT116 mock, Bcl-2 und Bcl-x_L Zellen fragmentierte DNA (Abb. 10C). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass HA14-1 Apoptose unabhängig vom Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-Expressionsstatus der Zellen induzierte.

Des Weiteren wurde das putative BH3-Mimetikum BH3I-2' in den gleichen Zellsystemen untersucht. Auch eine Behandlung mit 50 µM BH3I-2' induzierte in ca. 60 % der Jurkat mock Zellen Apoptose (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu wiesen nur ca. 35 % der Jurkat Bcl-x_L Zellen einen hypodiploiden DNA-Gehalt auf. In BJAB mock Zellen zeigten 90 % der Zellen und in BJAB Bcl-x_L Zellen ca. 73 % der Zellen DNA-Fragmentierung nach Behandlung mit 50 µM BH3I-2' (Abb. 10B). Die BH3I-2'-induzierte Apoptose wurde also durch die Überexpression von Bcl-x_L in Jurkat Zellen schwach, in BJAB Zellen bei niedrigen Konzentrationen stark und bei hohen Konzentrationen schwach gehemmt. Aus Abb. 10C wird ersichtlich, dass auch in HCT116 Zellen die Überexpression von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 die BH3I-2' induzierte Apoptose leicht hemmte. Die Behandlung mit 30 µM BH3I-2' führte in keinem der drei Zellsysteme zur deutlichen Induktion von Apoptose.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zytostatika-induzierte Apoptose in den verschiedenen Zellsystemen durch die Überexpression von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 gehemmt wurde, wohingegen die verwendeten BH3-Mimetika Gossypol und HA14-1 diesen zytoprotektiven Effekt von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L komplett überwand. BH3I-2' konnte den protektiven Effekt von Bcl-2 und Bcl-x_L nur zum Teil überwinden.

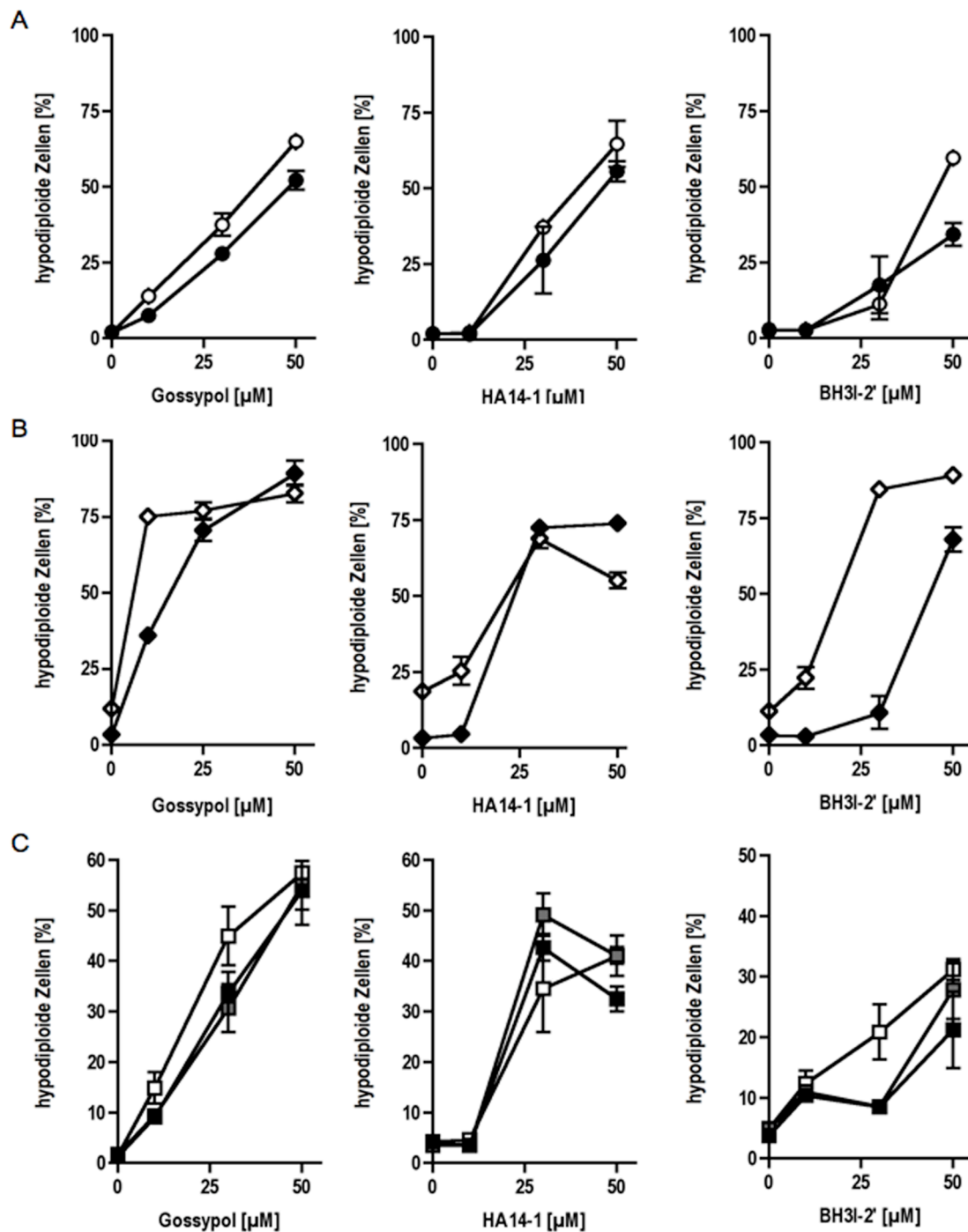


Abb. 10: BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig vom Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-Expressionsstatus

Zellen wurden mit steigenden Dosen Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2' behandelt und 72 Stunden inkubiert.

A Dargestellt ist der Prozentsatz von Jurkat mock (weiße Kreise) bzw. Jurkat Bcl-x_L (schwarze Kreise) Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt nach Behandlung mit Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2'.

B Apoptotische BJAB mock (weiße Rauten) und BJAB Bcl-x_L (schwarze Rauten) Zellen sind in % nach Behandlung mit den BH3-Mimetika Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2' dargestellt.

C HCT116-mock (weiße Quadrate), HCT116 Bcl-2 (graue Quadrate) und HCT116 Bcl-x_L (schwarze Quadrate) sind in % apoptotische Zellen dargestellt.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

5.1.3 BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig von Bax und Bak

Bislang haben wir gezeigt, dass Gossypol, HA4-1 und BH3I-2' Apoptose unabhängig vom Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-Expressionsstatus induzieren und somit die durch diese Proteine vermittelte Apoptoseresistenz überwinden können. Handelt es sich um echte BH3-Mimetika, so ist die Apoptoseinduktion abhängig von Bax und Bak. Um die Bax/Bak Abhängigkeit der drei BH3-Mimetika im Zusammenhang des intrinsischen Apoptosewegs untersuchen zu können, wurden HCT116 wt (HCT116 Bax+/Bak+) Zellen und HCT116 Bax ko/Bak kd (Bax-/Bak-) Zellen verwendet. HCT116 Bax+/Bak+ Zellen exprimierten sowohl Bax als auch Bak, wohingegen HCT116 Bax-/Bak- Zellen weder Bax noch Bak exprimierten (Abb. 11A). Unbehandelte Kolonkarzinomzellen wiesen nach 72 Stunden eine nur geringe Grundapoptose auf. Die Inkubation von HCT116 Zellen mit Gossypol führte zur Erhöhung der Apoptoserate. Nach einer Behandlung mit 50 µM Gossypol zeigten sowohl ca. 45 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen als auch 50 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen fragmentierte DNA (Abb. 11B). Die Apoptoserate war somit unabhängig von Bax und Bak. Die durch 50 µM HA14-1-induzierte Apoptose lag in HCT116 Bax+/Bak+ und HCT116 Bax-/Bak- Zellen bei ca. 75 % (Abb. 11B). Auch die Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit HA14-1 führte somit unabhängig vom Bax/Bak-Expressionsstatus zum Zelltod. Die Behandlung mit 30 µM BH3I-2' resultierte in beiden Zelllinien in ca. 25 % apoptotischen Zellen. HCT116 Bax-/Bak- Zellen zeigten auch nach einer Behandlung mit 50 µM BH3I-2' nur einen schwachen Anstieg der Apoptoserate, wohingegen diese in HCT116 Bax+/Bak+ Zellen verdoppelt war.

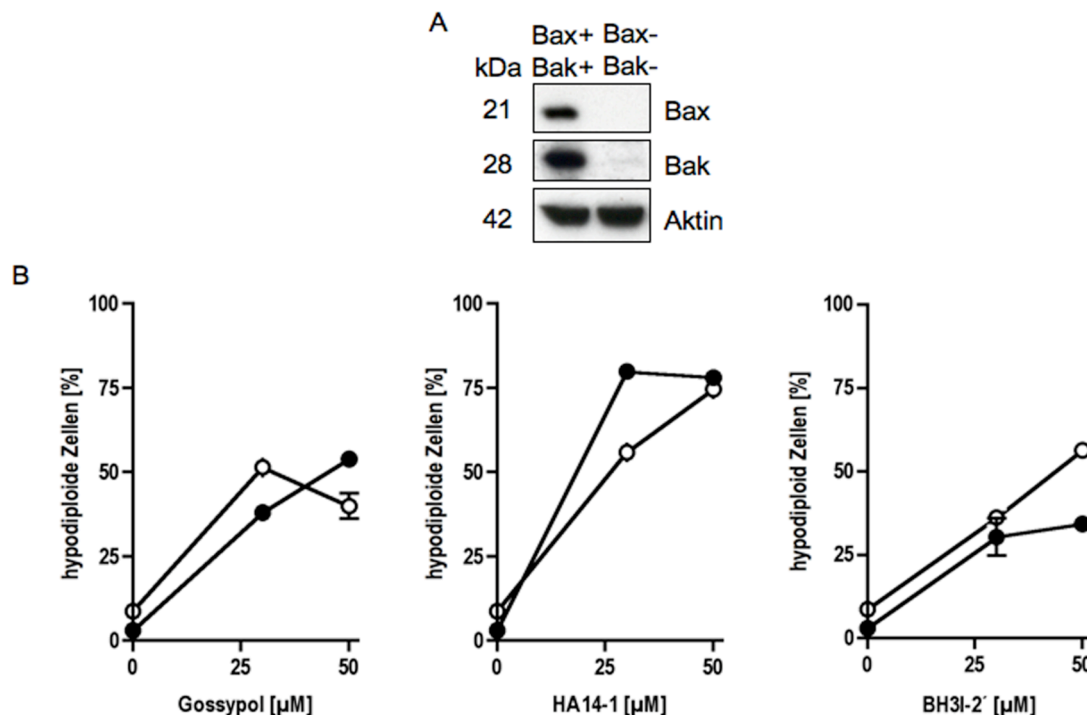


Abb. 11: BH3-Mimetika induzieren Zelltod in HCT116 Bax+/Bak+ und HCT116 Bax-/Bak- Zellen

A Westernblotanalyse von Bax und Bak in HCT116 Bax+/Bak+ und HCT116 Bax-/Bak- Zellen. Aktin diente als Ladekontrolle.

B Dargestellt ist die dosisabhängige Induktion von hypodiploiden Zellen in % nach Behandlung mit 30 bzw. 50 µM Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2'. HCT116 Bax+/Bak+ (weiße Kreise) und HCT116 Bax-/Bak- (schwarze Kreise) Zellen wurden 72 Stunden in Anwesenheit der BH3-Mimetika inkubiert und anschließend die Apoptoserate durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen, scheint der Wirkmechanismus von BH3I-2' somit zum Teil vom Bcl-2 Signalweg abzuhängen also von Bax, Bak, Bcl-x_L und Bcl-2. Im Gegensatz dazu wirken Gossypol und HA14-1 völlig unabhängig von Bax, Bak, Bcl-x_L und Bcl-2.

5.1.3.1 BH3-Mimetika induzieren den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Bcl-2 Inhibitoren Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' (zum Teil) DNA-Fragmentierung in Kolonkarzinomzellen unabhängig von Bax und Bak auslösen. Um die Rolle des intrinsischen Apoptosewegs zu untersuchen, wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, ein charakteristisches Kennzeichen der mitochondrialen Apoptose, analysiert. Die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials wurde mit dem kationischen, potentialabhängigen, sich in Mitochondrien anreichernden Fluorochrom JC-1 analysiert. Apoptosesignale bewirken die Herabsetzung des Membranpotentials, d.h. es lassen sich bei der Messung vermehrt Zellen mit verminderter Fluoreszenz nachweisen. Die JC-1 Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch auf Einzelzellniveau gemessen. Der prozentuale Anteil von Zellen mit verminderter Fluoreszenz wurde für die quantitative Auswertung verwendet. Nach Behandlung mit 30 μ M Gossypol zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen rund 65 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen und auch 65 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen ein reduziertes mitochondriales Membranpotential (Abb. 12). Die Behandlung mit HA14-1 führte ebenfalls im Vergleich zu Kontrollzellen in 75 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen und auch in 80 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 12). Im Gegensatz zu HCT116 Bax+/Bak+ Zellen wo ca. 50 % der Zellen ein reduziertes Mitochondrienmembranpotential aufwiesen, zeigten nur 25 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen ein reduziertes Membranpotential nach BH3I-2'-Behandlung (Abb. 12). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die putativen BH3-Mimetika Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' unabhängig von Bax und Bak die Mitochondrien aktivieren, wobei dies nur zum geringen Teil auf BH3I-2' zutrifft.

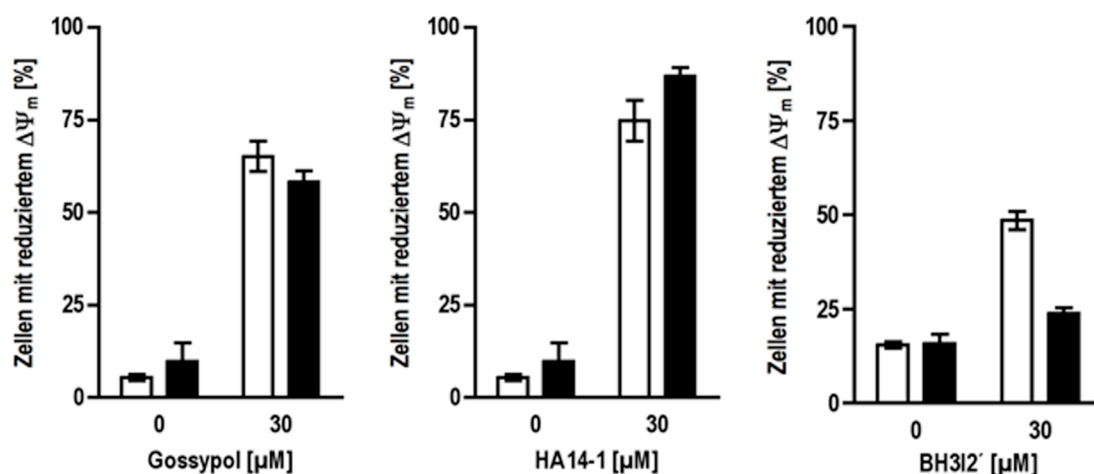


Abb. 12: BH3-Mimetika induzieren den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials
HCT116 Bax+/Bak+ (weiße Balken) und HCT116 Bax-/Bak- (schwarze Balken) Zellen wurden mit 30 μ M Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2' behandelt und nach 48 Stunden mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 gefärbt, der abhängig vom Membranpotential in den Mitochondrien akkumuliert. Dargestellt sind Zellen mit reduzierter Fluoreszenzintensität in %, welche durchflusszytometrisch erfasst wurden.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

5.1.3.2 Caspasen werden durch BH3-Mimetika aktiviert

Gossypol, HA14-1 und zum Teil auch BH3I-2' induzierten DNA-Fragmentierung und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials unabhängig von Bax und Bak. DNA-Fragmentierung und die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials gelten als Kennzeichen der Apoptose. Um die These der von Bax und Bak unabhängigen Apoptose stützen zu können, wurden die verwendeten BH3-Mimetika auf die Fähigkeit der Caspaseaktivierung untersucht. FAM-VAD-FMK bzw. FAM-DEVD-FMK sind fluoreszenzmarkierte Substratinhibitoren der Caspaseaktivität, welche kovalent an einen Cysteinrest der großen aktiven Caspaseuntereinheit binden. FAM-VAD-FMK bindet an Caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8 und -9 und inhibiert somit nahezu alle Caspasen, wohingegen FAM-DEVD-FMK nur an die Caspasen-3 und -7 bindet. Ungebundene Inhibitoren werden aus den Zellen ausgewaschen. Die Behandlung mit Gossypol bzw. HA14-1 resultierte im Vergleich zu unbehandelten Zellen sowohl in HCT116 Bax+/Bak+ als auch in HCT116 Bax-/Bak- Zellen in der Aktivierung von Caspasen (Abb. 13A). Ca. 75 % der HCT116 Bax+/Bak+ und auch der HCT116 Bax-/Bak- Zellen zeigten nach einer Inkubation mit 30 µM Gossypol Caspaseaktivität. Die 48-stündige Inkubation mit 30 µM HA14-1 führte zu ca. 55 % caspaseaktivierten HCT116 Bax+/Bak+ und HCT116 Bax-/Bak- Zellen. Zur genaueren Charakterisierung der Caspaseaktivierung wurde weiterhin die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 überprüft. So induzierte Gossypol im Vergleich zu Kontrollzellen in ca. 70 % der HCT116 Bax+/Bak+ aber auch in 75 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen Caspase-3/-7 Aktivierung (Abb. 13B). Auch die Behandlung mit 50 µM HA14-1 führte nach 48-stündiger Behandlung sowohl in ca. 60 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen als auch in 75 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen zu aktivierten Effektorcaspasen. Die Behandlung von HCT116 Bax-/Bak- Zellen mit 50 µM BH3I-2' resultierte in ca. 25 % der Zellen in Pancaspaseaktivität, wohingegen ca. 55 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen Caspaseaktivität zeigten (Abb. 13A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Pancaspaseaktivität nach BH3I-2' Behandlung zeigten auch nur 25 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen Effektorcaspase-Aktivität im Vergleich zu HCT116 Bax+/Bak+ Zellen (Abb. 13B).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass neben der DNA-Fragmentierung und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auch die Aktivierung von Caspasen im Zuge des durch Gossypol bzw. HA14-1 induzierten, Bax und Bak unabhängigen Zelltods beobachtet wurde. BH3I-2' induzierte Caspaseaktivität hingegen weitgehend Bax/Bak-abhängig.

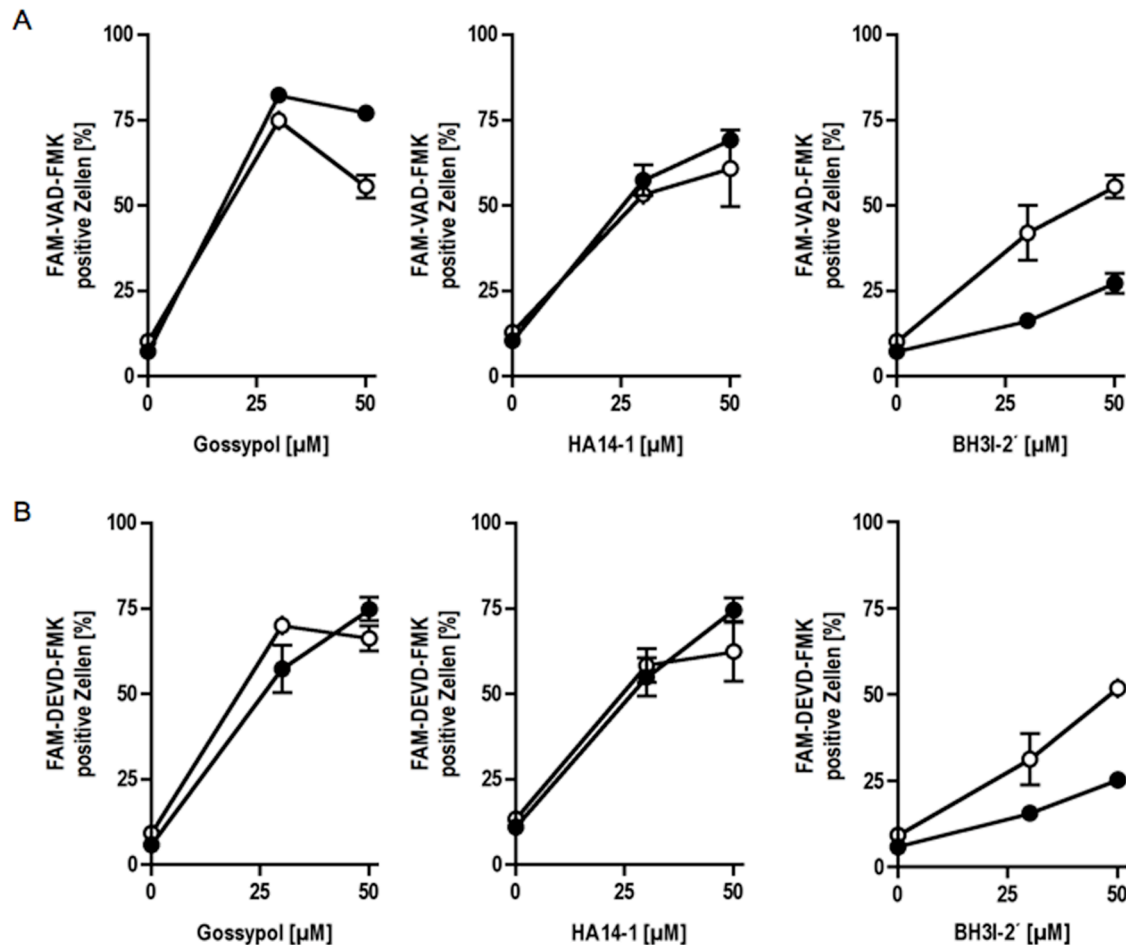


Abb. 13: BH3-Mimetika aktivieren Caspasen

HCT116 Bax⁺/Bak⁺ (weiße Kreise) und HCT116 Bax⁻/Bak⁻ (schwarze Kreise) Zellen wurden 48 Stunden nach der Behandlung mit Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2' mit fluoreszenzmarkierten, irreversibel bindenden Substratinhibitoren der Caspaseaktivität inkubiert. Zellen mit aktivierten Caspasen fluoreszieren und werden durchflusszytometrisch erfasst.

A Dargestellt sind FAM-VAD-FMK positive Zellen in %, welche Pancaspase-aktivierten Zellen entsprechen.

B FAM-DEVD-FMK positive Zellen sind in % dargestellt. Dies entspricht Caspase-3/-7-aktivierten Zellen.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten \pm Standardabweichung gezeigt.

5.2 Verschiedene Spleißvarianten des Noxa-Gens

Im Zuge der Recherchen zu Noxa_s wurden zwei verschiedene Proteinsequenzdatenbankeinträge gefunden. Bei genauerer Betrachtung stellten wir fest, dass es sich bei einem der Einträge um das bekannte Protein Noxa_s (UniProtKB/Swiss-Prot Eintrag: Q13794) handelte und bei dem zweiten um ein noch nicht charakterisiertes Protein mit dem Namen: PMAIP1 Protein (UniProtKB/TrEMBL Eintrag: Q8N589). Sequenzanalysen und weitere Datenbankrecherchen ergaben, dass es sich bei Noxa_s (Accession No. NM_021127) und PMAIP1 Protein (Accession No. BC032663) um zwei Spleißvarianten des humanen Gens *noxa* handelt. Das humane Gen *noxa* ist auf Chromosom 18q21.32 (Accession No. AC090377) lokalisiert und besteht aus drei Exons und zwei Introns (Abb. 14). Die mRNA des bereits beschriebenen *noxa* (siehe Kapitel 1.4.3.1) enthält Exon 1 und 3 und kodiert für ein 54 Aminosäuren langes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 6 kDa, wobei die BH3-Domäne in Exon 3 kodiert ist. Die zweite Spleißvariante *PMAIP1 Protein*, im Folgenden *noxa_L* genannt,

enthält alle drei Exons, allerdings kommt es beim Spleißen des Introns 2 im Vergleich zu *noxas* zu einer Verschiebung im Leserahmen, wodurch *noxal* keine BH3-Domäne enthält (Abb. 14). Die mRNA von *noxal* kodiert für ein 136 Aminosäuren langes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 14,9 kDa. *Noxas* und *Noxal* sind in den ersten 19 Aminosäuren identisch, welche von Exon 1 kodiert werden, danach aber aufgrund von Exon 2 und der spleißbedingten Verschiebung des Leserahmens des Exons 3 in der Aminosäuresequenz von einander abweichen.

Introns in proteinkodierenden Genen unterscheiden sich erheblich in ihrer Länge und Sequenz. Kurze Bereiche an den Grenzen der Intron-Exon-Grenzen sind aber meist identisch. So sind die ersten beiden Basen eines Introns fast immer Guanin-Thymin (GT) und die letzten beiden Basen eines Introns immer Adenin-Guanin (AG) [Knippers, 2001]. Man spricht daher auch von der GT-AG-Regel. Betrachtet man die Intron-Exon-Grenzen des Introns 2 des Noxa-Gens so wird deutlich, dass es möglicherweise noch eine dritte Spleißvariante von *noxas* gibt. Das Exon 2 endet mit den Basen GT und das Exon 3 beginnt mit den Basen AG (Abb. 14). Aufgrund der bisherigen Kenntnisse des Spleißmechanismus und der GT-AG-Regel, könnte man annehmen, dass auch diese Basen als Introngrenzen erkannt werden. Sollte dies der Fall sein, würde es noch eine dritte, völlig unbekannte Spleißvariante des Noxa-Gens geben, im Folgenden *noxal2* genannt. Aufgrund der „neuen“ Introngrenzen kommt es im Falle von *noxal2* zu einer Verschiebung des Leserahmens des Exons 3, der dazu führt, dass *noxal2* Exon 1, Exon 2 und Exon 3 mit BH3-Domäne enthält und für ein 103 Aminosäuren langes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 11 kDa kodiert. Eine schematische Darstellung der drei Spleißvarianten ist in Abb. 14 zu finden. Im Anhang ist zudem die genaue Sequenz angegeben.

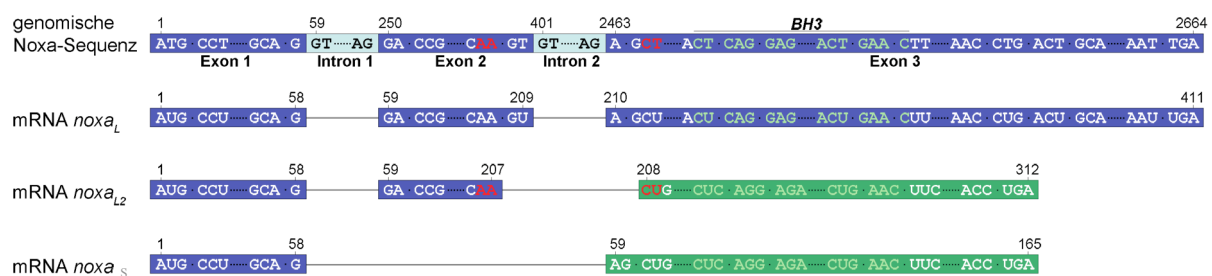


Abb. 14: Schematische Darstellung der möglichen Spleißvarianten von *noxas*

Exons 1 bis 3 sowie Introns 1 und 2 mit entsprechenden Spleißstellen der prä-mRNA des Noxa-Gens und die putativen Spleißvarianten *noxas*, *noxal* und *noxal2* mit den entsprechenden Exons und Spleißstellen sind dargestellt. Die Verschiebung des Leserahmens in Exon 3 ist durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet.

5.2.1 PMA reguliert *Noxas* und *Noxal*

Die Induktion des Gens *noxas* wurde erstmals nach Behandlung von leukämischen Zellen mit PMA beschrieben [Hijikata et al., 1990]. PMA ist ein Phorboldiester und wirkt als Tumorpromotor bzw. als Mitogen. Um zu überprüfen ob die Spleißvariante *noxal* auch durch PMA reguliert wird, wurden die humane myeloische Leukämiezelllinie HL60 und die humane leukämische Lymphomzelllinie U937 mit PMA behandelt. *noxal* wurde auf mRNA- und Protein-Expressionsniveau analysiert. Um die Veränderungen des mRNA-Expressionsniveaus nach Behandlung detektieren zu können, wurden *noxal* und das Referenzgen *c-Abl* mittels Taqman-PCR amplifiziert. Die Normalisierung der Spleißvariante *noxal* erfolgte gegen *c-Abl*, wodurch sich die relative Genexpression bestimmen ließ. Das relative mRNA-Expressionsniveau von *noxal* erhöhte sich in U937 Zellen nach 8-stündiger Behandlung mit 20 ng/ml PMA nicht (Abb. 15). Dagegen hatte sich das relative *noxal*-

mRNA-Expressionsniveau in U937 Zellen nach 8-stündiger Behandlung mit 200 ng/ml PMA im Vergleich zum mRNA-Niveau von unbehandelten Zellen um das 3,5-fache erhöht. Eine Induktion der mRNA von *noxal* war in HL60 Zellen nach 8-stündiger Behandlung mit PMA bereits bei einer Konzentration von 20 ng/ml deutlich (Abb. 15). So stieg in diesen Zellen das relative mRNA-Niveau von *noxal* nach Behandlung mit 20 ng/ml bzw. 200 ng/ml PMA jeweils um das 8-fache an. Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde das *noxal*-mRNA-Profil der beiden leukämischen Zellen nach Behandlung mit PMA auch gegen das Referenzgen *G6PDH* normalisiert. Ebenso hier zeigte *noxal* nach PMA-Behandlung einen Anstieg des relativen mRNA-Gehalts (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigte die gegen *c-Abl* normalisierten Ergebnisse.

Der in der RT-PCR verwendete reverse Primer bindet in dem Bereich des Exons 3, der für *noxal* kodiert aber nicht mehr für *noxal2*. Um zu überprüfen, ob im Zuge der RT-PCR wirklich *noxal* und nicht *noxal2* amplifiziert wurde, wurden die induzierten mRNAs von *noxal* über ein präparatives Gel isoliert und anschließend in einen pGemT-Vektor kloniert. Sequenzanalysen von 8 Konstrukten ergaben, dass alle isolierten mRNAs für *noxal* aber nicht für *noxal2* kodieren (Daten nicht gezeigt).

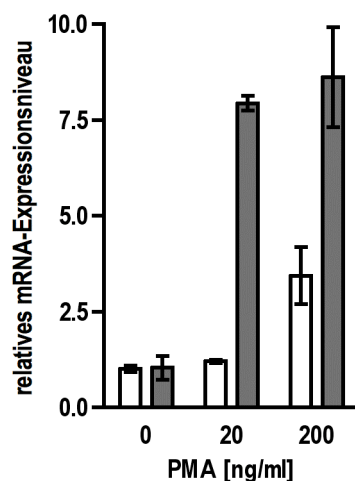


Abb. 15: PMA induziert die mRNA von *noxal* in U937 und HL60 Zellen

U937 (weiße Balken) und HL60 (graue Balken) Zellen wurden mit 0, 20 bzw. 200 ng/ml PMA für 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Realtime-PCRs mit *noxal* bzw. *c-Abl* Primern durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse für *noxal* wurden gegen das Referenzgen *c-Abl* normalisiert. Dargestellt ist das relative mRNA-Niveau von *noxal*. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten \pm Standardabweichung gezeigt.

Die Ergebnisse zur PMA-Behandlung von leukämischen Zellen haben gezeigt, dass *noxal* auf mRNA-Ebene induziert wurde. Es ergibt sich daher die Frage, ob auch der Proteinexpressionsstatus erhöht wird. Um eine Induktion von Noxa_S und Noxa_L nachweisen zu können, wurden HL60 und U937 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen PMA behandelt und nach 8- bzw. 24 Stunden geerntet, lysiert und abschließend mittels ECL-Westernblot analysiert. Es wurde ein N-terminal bindender polyklonaler Antikörper gegen Noxa_S verwendet, wodurch die gleichzeitige Detektion von Noxa_S, Noxa_{L2} und Noxa_L möglich wäre. In unbehandelten U937 Zellen konnte das Protein Noxa_L aber nicht das BH3-only Protein Noxa_S nachgewiesen werden (Abb. 16). Eine 8-stündige Behandlung von U937 Zellen mit 10, 20 und 200 ng/ml PMA resultierte in einer gesteigerten

Proteinexpression von Noxa_S. Für Noxa_L konnte eine Abnahme nachgewiesen werden (Abb. 16). Erst eine 24-stündige Behandlung mit 10, 20 und 200 ng/ml PMA führte zu einem erhöhten Noxa_L-Proteinspiegel. Zu diesem Zeitpunkt war die Proteinexpression von Noxa_S wieder unterhalb der Nachweisgrenze wie in Kontrollzellen. Unbehandelte HL60 Zellen zeigten ein geringes Proteinexpressionsniveau von Noxa_L aber keinerlei Expression von Noxa_S (Abb. 16). Nach 8-stündiger Behandlung der HL60 Zellen mit verschiedenen PMA-Konzentrationen war eine Zunahme der Proteinexpression von Noxa_S zu beobachten, wohingegen der Proteinspiegel von Noxa_L sank. 24 Stunden nach Behandlung konnten weder Noxa_S noch Noxa_L nachgewiesen werden. Noxa_{L2} wurde zu keinem Zeitpunkt in keiner Kondition detektiert.

Abschließend kann man festhalten, dass nach Stimulation mit PMA auch Noxa_L in U937 Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene induziert wurde. Die Behandlung mit PMA in HL60 Zellen führte ebenfalls zur Induktion von Noxa_L auf mRNA-Ebene nicht aber auf Proteinebene, dort war Noxa_L nach Behandlung nicht mehr nachweisbar.

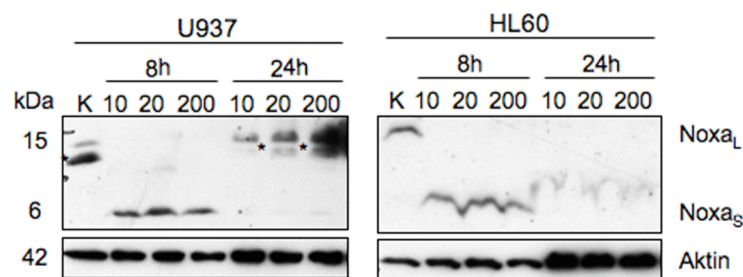


Abb. 16: PMA reguliert die Proteinexpression von Noxa_S und Noxa_L in leukämischen Zellen
 Westernblotanalyse von Noxa_S, Noxa_L und Aktin in unbehandelten (Kontrollzellen, K) Zellen und Zellen nach 8- bzw. 24-stündiger Behandlung mit 10, 20 bzw. 200 ng/ml PMA. Aktin diente als Ladekontrolle. Die mit * markierten Banden sind unspezifisch. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist gezeigt.

5.2.2 Proteasominhibitoren induzieren Noxa_S und Noxa_L

Bortezomib ist ein 26S Proteasominhibitor, der bereits in klinischen Phase 1, 2 und 3 Studien für die Therapie von multiplen Myelomen eingesetzt wird [Roccaro et al., 2006]. Qin et al. konnten im Jahr 2005 erstmals zeigen, dass die Verwendung von Bortezomib Noxa_S sowohl auf Proteinebene stabilisiert als auch auf mRNA-Ebene induziert [Perez-Galan et al., 2006; Qin et al., 2005]. Um zu untersuchen, ob auch die zweite Spleißvariante des Noxa-Gens (Noxa_L) durch Bortezomib induziert wird, behandelten wir Kolonkarzinomzellen (HCT116 Bax+/Bak+) und Prostatakarzinomzellen (DU145 wt) mit verschiedenen Konzentrationen Bortezomib. Nach 8-stündiger Inkubation von HCT116 Zellen mit 0,05 µM bzw. 1 µM Bortezomib war das relative mRNA-Niveau von *noxa_L* im Vergleich zu unbehandelten Zellen um das 3-fache erhöht (Abb. 17). In DU145 Zellen blieb dagegen der relative mRNA-Spiegel von *noxa_L* nach einer Inkubation mit 0,05 µM Bortezomib im Vergleich zu unbehandelten Zellen unverändert (Abb. 17). Erst eine Behandlung mit 1 µM Bortezomib induzierte die *noxa_L*-mRNA in DU145 Zellen um das 4-fache (Abb. 17). Wie zuvor wurde zur Überprüfung der Ergebnisse das mRNA-Niveau von *noxa_L* zusätzlich gegen das Referenzgen *G6PDH* normalisiert. Die Zunahme des relativen mRNA-Gehalts von *noxa_L* nach Bortezomib-Behandlung in den Karzinomzellen konnte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Proteasominhibitor Bortezomib induziert somit *noxa_L* auf mRNA-Ebene.

Die induzierten mRNAs von *noxal* wurden erneut in einen pGemT-Vektor kloniert und 8 Klone sequenziert. Auch hier zeigten die Sequenzanalysen, dass es sich bei allen untersuchten Klonen um *noxal* und nicht um *noxal2* handelte (Daten nicht gezeigt).

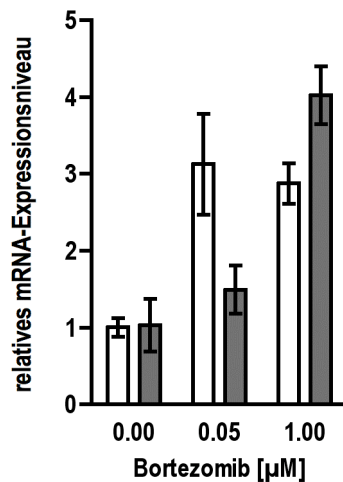


Abb. 17: Bortezomib induziert *noxal*-mRNA in HCT116 und DU145 Zellen

*HCT116 (weiße Balken) und DU145 (graue Balken) Zellen wurden mit 0; 0,05 bzw. 1 µM Bortezomib 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Realtime-PCRs mit *noxal* bzw. *c-Abl* Primern durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse von *noxal* wurden gegen das Referenzgen *c-Abl* normalisiert. Dargestellt ist das relative mRNA-Niveau von *noxal*. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.*

Aufgrund der Induktion von Noxa_L nach Bortezomib-Behandlung auf mRNA-Ebene ergibt sich die Frage, ob auch das Proteinexpressionsniveau der beiden Spleißvarianten erhöht wird. Dies wurde mittels Westernblot untersucht, wobei ein N-terminal bindender polyklonaler Antikörper gegen Noxa, der die Detektion von Noxa_S, Noxa_{L2} und Noxa_L gleichzeitig ermöglicht, Verwendung fand. Unbehandelte Kolonkarzinomzellen wiesen eine geringe Proteinexpression von Noxa_S aber keine von Noxa_L auf (Abb. 18). Eine 8-stündige Bortezomib-Behandlung von HCT116 Zellen führte bereits zu einer deutlichen Steigerung des Noxa_S-Proteinexpressionsniveaus und zu einer schwachen Induktion von Noxa_L (Abb. 18). Die Steigerung der Proteinexpression von Noxa_S und Noxa_L in HCT116 Zellen nahm nach 24 Stunden nochmals zu. Wie bereits in HCT116 Kolonkarzinomzellen beobachtet, weisen auch unbehandelte DU145 Prostatakarzinomzellen keine Proteinexpression von Noxa_L und eine nur geringe von Noxa_S auf. Die Behandlung dieser Zellen mit Bortezomib führte zu einem starken Anstieg der Noxa_S-Expression nach 8 Stunden, die nach 24 Stunden nochmals gesteigert war. Auch Noxa_L wurde stark in DU145 Zellen induziert, allerdings nur nach 8 Stunden bei einer Konzentration von 0,1 µM Bortezomib. Eine 24-stündige Behandlung mit 1 µM Bortezomib resultierte in einer Zunahme des Proteinspiegels von Noxa_L im Vergleich zum Kontroll- und 8-Stunden-Expressionsprofil (Abb. 18). Betrachtet man diese Ergebnisse, so ist offensichtlich, dass Noxa_S stärker induziert wurde als Noxa_L.

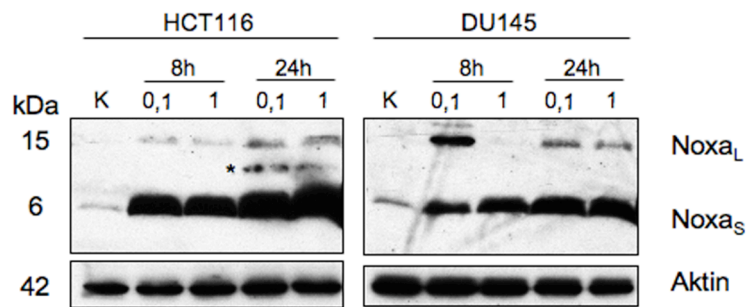


Abb. 18: Bortezomib induziert die Proteinexpression von Noxa_S und Noxa_L in HCT116 und DU145 Zellen

Westernblotanalyse von Noxa_S, Noxa_L und Aktin (Ladekontrolle) in unbehandelten (Kontrolle, K) Zellen und Zellen nach 8- bzw. 24-stündiger Behandlung mit 0,1 bzw. 1 μ M Bortezomib. Aktin diente als Ladekontrolle. Die mit * markierten Banden sind unspezifisch. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Es ist jeweils ein Beispiel gezeigt.

Zusammenfassend wird deutlich, dass der Proteasominhibitor Bortezomib Noxa_L sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in Karzinomzellen induzierte. Auch eine Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 führte zur Induktion von Noxa_L (Daten nicht gezeigt).

5.3 Herstellung der rekombinanten Adenoviren AdNoxa_S und AdNoxa_L

Um den Wirkmechanismus von Noxa_S bzw. Noxa_L im Zuge der Apoptose untersuchen zu können, sollte Noxa_S bzw. Noxa_L in verschiedenen Zellmodellen transient überexprimiert werden. Dazu wurden replikationsinkompetente Adenoviren hergestellt. Die Methode zur Konstruktion rekombinanter, replikationsdefizienter adenoviraler Vektoren wurde nach dem von Chartier publizierten Protokoll modifiziert durchgeführt [Chartier et al., 1996]. Der offene Leserahmen (ORF) des zu exprimierenden Proteins wurde zunächst in einen Shuttleplasmid kloniert. Dieses enthält virale Sequenzen, welche die homologe Rekombination mit einem Plasmid des Adenovirus-Serotyp5-Genoms ermöglichte, der in der E1- und E3-Region deletiert ist. Die E3-Region wurde durch die tTA-Expressionskassette ersetzt [Gillissen et al., 2003]. Im nächsten Schritt erfolgte die homologe Rekombination zwischen überlappenden homologen Sequenzen des adenoviralen Plasmids und dem Shuttleplasmid *in vivo* in Bakterien. Das nach der homologen Rekombination entstandene rekombinante Plasmid enthält die Noxa_S- bzw. Noxa_L-Expressionskassette in der E1-Region und wird zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren in HEK293 Zellen transfiziert. Die E1-Funktionen sind essentiell für die Adenovirusreplikation und können durch HEK293 Zellen, welche die viralen Gene E1A und E1B tragen und sie somit *in trans* zur Verfügung stellen, komplementiert werden [Graham et al., 1977].

5.3.1 Klonierung der Transferplasmide

5.3.1.1 pcDNA3.1-Noxa_S, pcDNA3.1-Noxa_L

Der humane Noxa_S -ORF (Nucleotide Accession No. D90070) wurde über modifizierte Primer mittels PCR amplifiziert, wobei die Primer Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI (5' Ende) und *Xba*I (3' Ende) anfügten. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I verdaut und gerichtet in

den mit *Bam*HI und *Xba*I gespaltenen pcDNA3.1+ Vektor kloniert (Abb. 19). Die korrekte Basen-folge der DNA wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Klonierung für den humanen Noxa_L-ORF (Firma ImaGenes: IRATp970F0255D) erfolgte analog.

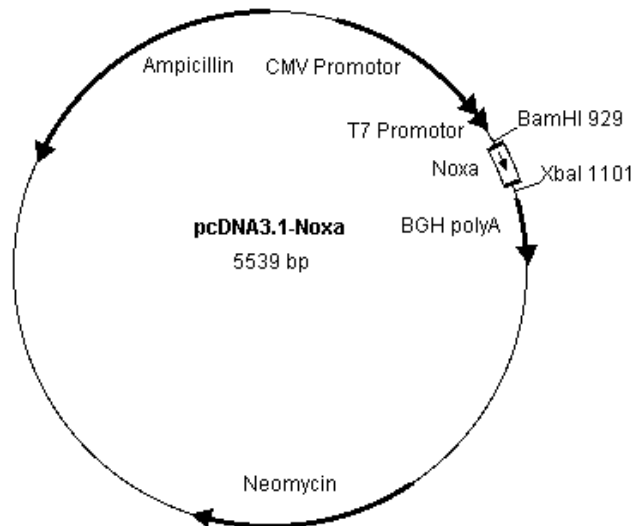


Abb. 19: Vektorkarte von pcDNA3.1-Noxa_S

Der Vektor pcDNA3.1-Noxa_L (5784bp) ist prinzipiell identisch. Aufgrund der Größe des ORFs verschiebt sich die Schnittstelle *Xba*I (1347bp).

5.3.1.2 pAd2-MycNoxa_S, pAd2-MycNoxa_L

Der Noxa_S-ORF wurde aus pcDNA3.1-Noxa_S mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xba*I isoliert und gerichtet in den mit *Bam*HI und *Xba*I gespaltenen Shuttlevektor pAd2-TRE kloniert. Dieser enthält am 5' Ende der *Bam*HI Restriktionsschnittstelle eine Myc-Markierung (Abb. 20). Somit entsteht ein C-terminal Myc-markiertes MycNoxa_S-Fusionsprotein. Analog dazu erfolgte die Klonierung von Noxa_L. Die Vektorkonstrukte wurden mittels verschiedener Restriktionstests überprüft.

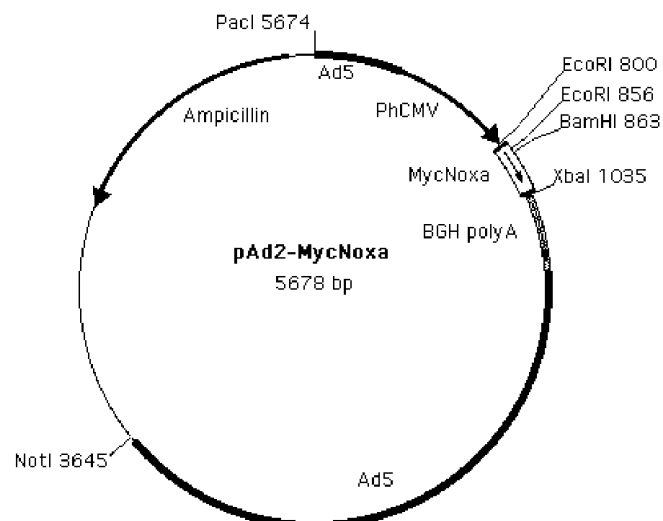
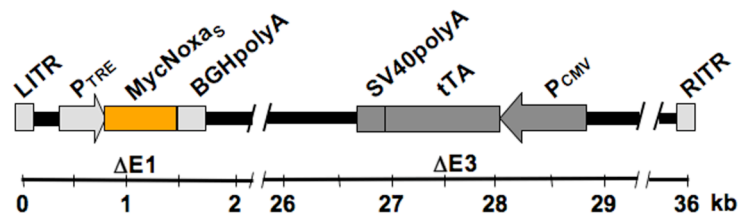


Abb. 20: Shuttleplasmid pAd2-MycNoxa_S

Der Vektor pAd2-MycNoxa_L (5924bp) ist prinzipiell identisch. Aufgrund der Größe des ORFs verschiebt sich die Schnittstelle XbaI (1281bp).

5.3.2 Herstellung der adenoviralen Plasmide und Generierung der Adenoviren

Das Plasmid des Adenovirusgenoms pAd-Del.1.3+tTA ist in der E1-Region deletiert und enthält in der E3-deletierten Region den tTA (tetracycline-controlled transactivator). Für die homologe Rekombination der Expressionskassette des Shuttlevektors und des Adenovirusgerüsts wurden *NotI* und *PacI* geschnittenes Shuttleplasmid pAd2-MycNoxa_S gemeinsam mit *ClaI* linearisiertem Vektor pAd-Del.1.3+tTA mittels Elektroporation in elektrokompente, Rekombinase-profiziente BJ5183 Zellen kotransformiert. Die erfolgreiche homologe Rekombination wurde mittels Restriktionstests überprüft. Ein Klon der erfolgreich homolog rekombinierten Plasmide wurde dann mit *PacI* geschnitten, um den bakteriellen Plasmidanteil des Vektors zu entfernen, und in HEK293 Zellen transfiziert. Die Klonierung erfolgte in gleicher Weise für Noxa_L. Die Adenovirusamplifikation und Aufreinigung wurde wie in Material und Methoden (siehe Kapitel 4.1.13-15) beschrieben durchgeführt. Die aufgereinigten Adenoviren AdNoxa_S (Abb. 21) und AdNoxa_L wurden anschließend mittels PCR auf E1A-Gehalt getestet und die Virentiter in HEK293 Zellen mittels Plaquetest bestimmt. Für die Virusexperimente wurden nur E1A negativ getestete Adenoviren verwendet.

**Abb. 21: Schematischer Aufbau des AdNoxa_S-Genoms**

Das Genom des AdNoxa_S-Vektors enthält in der E1-deletierten Region (ΔE1) die Noxa_S-Expressionskassette mit Promotor (*P_{TRE}*), MycNoxa_S und dem BGH Polyadenylierungssignal. Diese erlaubt die regulierbare Expression von MycNoxa_S. In der E3-deletierten Region (ΔE3) befindet sich die Expressionskassette des Transaktivators mit dem Promotor (*P_{CMV}*), tTA und dem SV40 Polyadenylierungssignal. Die Enden des adenoviralen Genoms werden von dem linken und rechten „inverted terminal repeat“ (ITR) flankiert. Das Genom des Adenovirus AdNoxa_L entspricht dem des AdNoxa_S, nur anstelle des ORF von Noxa_S enthält es den ORF von Noxa_L.

5.3.3 Regulierbare Expression von Noxa_S und Noxa_L

Die rekombinanten Adenoviren ermöglichen eine regulierbare Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L. Diese beruht auf dem Tet-off System. Die Transkription des Zielgens wird in Anwesenheit von Doxycyclin unterdrückt und in Abwesenheit von Doxycyclin wird das Zielgen transkribiert. Doxycyclin bindet an den tTA und verhindert dadurch dessen Bindung an das TRE (Tet-responsive Element), welches vor dem minimalen CMV-Promotor liegt [Gossen und Bujard, 1992]. Die Bindung des tTA an das TRE hingegen aktiviert die Transkription des Zielgens. In den folgenden Abschnitten der Arbeit wird die Anwesenheit von Doxycyclin in den Versuchsbedingungen als off-Kondition und die Abwesenheit von Doxycyclin, wenn die Transkription des Zielgens erfolgt, als on-Kondition bezeichnet.

Alle im Zuge dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Labor etabliert und verwendet. Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass all diese Zelllinien mit Adenoviren infiziert werden können. Aufgrund dessen wurde im Zuge dieser Arbeit darauf verzichtet diesen Nachweis nochmals zu erbringen [Gillissen et al., 2003; Gillissen et al., 2007].

Mittels Westernblotanalyse wurde die Funktionalität des Tet-off Systems der rekombinanten Adenoviren überprüft. Wie in nicht infizierten Zellen, war auch unter off-Kondition keine Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L detektierbar. Hingegen wurde, wie erwartet, unter on-Kondition eine starke Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L sichtbar (Abb. 22). MycNoxa_S und MycNoxa_L sind Fusionsproteine. Aufgrund der Klonierungsstrategie ist sowohl das Startkodon der Myc-Markierung als auch das Startkodon von Noxa_S in der Zielsequenz enthalten, wodurch es zur Transkription von *mycnoxa_S* und *noxa_S* kommen kann. Dies hat zur Folge, dass im Westernblot oft eine Doppelbande sichtbar wurde (gleiches gilt für Noxa_L).

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Expression abhängig von der eingesetzten Virenkonzentration erfolgte. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen MOI (multiplicity of infection) infiziert, die die eingesetzte Anzahl von Viruspartikeln pro Zelle angibt. Mit steigender Virenkonzentration pro Zelle nahm die Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L unter on-Kondition deutlich zu (Abb. 22). Unter off-Kondition war auch bei hohen MOI keine oder nur eine sehr geringe Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L zu erkennen.

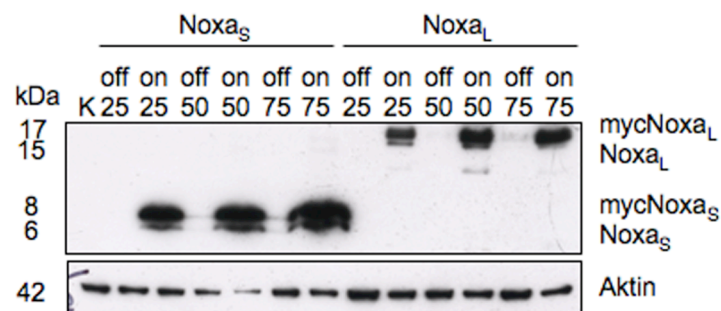


Abb. 22: Proteinexpression von Noxa_S und Noxa_L nach Adenovirusinfektion

HCT116 Zellen wurden unbehandelt (Kontrolle, K) oder mit 25-75 MOI AdNoxa_S bzw. AdNoxa_L infiziert und unter off- sowie on-Kondition 24 Stunden inkubiert. Zelllysate wurden angefertigt und die Expression von Noxa_S und Noxa_L mittels ECL-Westernblot überprüft. Aktin diente als Ladekontrolle.

5.4 Das BH3-only Protein Noxa_S induziert Apoptose in Zervixkarzinomzellen

Um den Wirkmechanismus von Noxa_S und Noxa_L zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit den hergestellten Adenoviren AdNoxa_S bzw. AdNoxa_L infiziert. Im Gegensatz zur Überexpression von Noxa_L, welche keine Apoptose induzierte (Abb. 23D), induzierte die Überexpression von Noxa_S Apoptose in HeLa Zellen (Abb. 23A-C). Die mikroskopischen Hellfeldaufnahmen der Abb. 23A zeigen, dass Zellen 24 Stunden nach Noxa_S-Infektion unter off-Kondition und unbehandelte Zellen (Kontrolle) morphologisch normal aussahen, da sie flächig am Boden angeheftet waren. Das Bild der on-Kondition (Abb. 23A) zeigt dagegen deutlich, dass die Zellen nach Noxa_S-Expression abgerundet waren und sich von der Oberfläche abgelöst haben. Dies ist ein spätes Zeichen der Apoptose. Zur weiteren Charakterisierung des Zelltods wurden der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die DNA-Fragmentierung, als typische Kennzeichen der Apoptose untersucht. Nach 30 Stunden

wiesen ca. 45 % der Zellen unter on-Kondition im Vergleich zu Zellen der off-Kondition bzw. unbehandelten Zellen ein reduziertes mitochondriales Membranpotential auf (Abb. 23B). Der DNA-Gehalt nicht infizierter Zellen und Zellen der off-Kondition blieb unverändert (Abb. 23C). Im Gegensatz dazu zeigten nach 72 Stunden ca. 65 % der Zellen nach Noxa_S-Expression fragmentierte DNA (Abb. 23C).

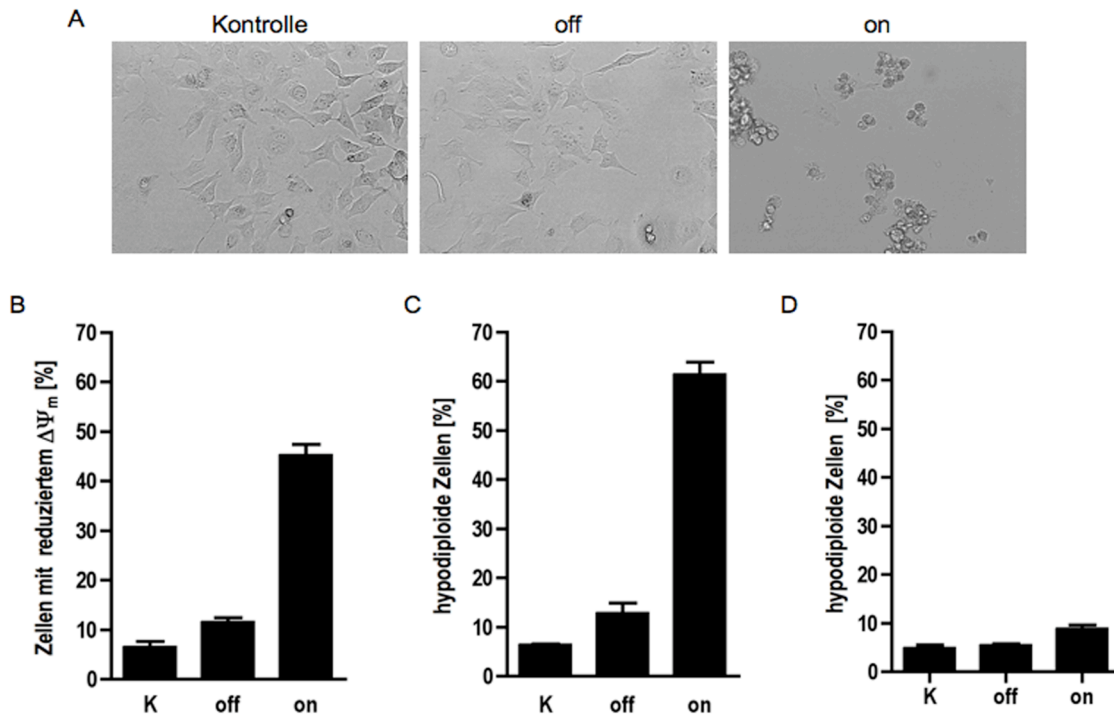


Abb. 23: Die Expression von Noxa_S induziert Apoptose in HeLa Zellen

Gezeigt sind unbehandelte Zellen (K) und mit 25 MOI AdNoxa_S infizierte Zellen der off- und on-Kondition.

A Mikroskopische Hellfeldbilder wurden mit 400-facher Vergrößerung 24 Stunden nach AdNoxa_S-Infektion aufgenommen.

B 30 Stunden nach AdNoxa_S-Infektion wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 gefärbt, der abhängig von Membranpotential in der Mitochondrienmatrix akkumuliert. Dargestellt sind Zellen mit reduziertem mitochondrialen Membranpotential in %, welche durchflusszytometrisch erfasst wurden.

C Dargestellt sind hypodiploide Zellen (apoptotische Zellen) in % nach Infektion mit AdNoxa_S. Die Zellen wurden infiziert, 72 Stunden inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

D Dargestellt ist die Apoptoserate in % nach Infektion mit AdNoxa_S. Die Zellen wurden infiziert, 72 Stunden inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

Die Aktivierung der Mitochondrien führt zur Freisetzung von verschiedenen pro-apoptotischen Faktoren ins Zytoplasma. Das zu diesen Faktoren gehörende Cytochrom c bildet mit dem Adapterprotein APAF-1, dATP und der Procaspase-9 (Pro-C9) einen Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird. In diesem Komplex wird die Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9 (C9) prozessiert, die wiederum Effektorcaspasen wie die Procaspase-3 (Pro-C3) spaltet und hierdurch aktiviert. Wir wollten untersuchen, ob nach Induktion von Noxa_S auch die Prozessierung der Procaspasen-9 und -3, als weitere Merkmale der Apoptose, auftreten. Aus diesem Grund wurden HeLa Zellen mit 25 MOI AdNoxa_S infiziert und unter off- sowie on-Kondition 24 Stunden inkubiert und anschließend mittels Westernblot analysiert. Im Vergleich zu Zellen der off-Kondition wurde in Zellen nach Noxa_S-Expression die Abnahme der Procaspase-9 (42 kDa) und der Procaspase-3 (32 kDa) detektiert. Zusätzlich konnte in der on-Kondition die 37 kDa Spaltform der Caspase-9 und die aktive Untereinheit (17 kDa) der

Caspase-3 nachgewiesen werden (Abb. 24A). Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein nukleäres Enzym und katalysiert den Transfer von ADP-Ribose-Polymeren nach DNA-Strangbrüchen. Das Enzym wird während der Apoptose in ein 85 und ein 24 kDa schweres Fragment gespalten. Die Überexpression von Noxa_S (on-Kondition) resultierte in der Spaltung von PARP, wobei im Westernblot das 85 kDa Spaltprodukt deutlich zu erkennen war.

Apoptose wird über das quantitative Verhältnis der Bcl-2-Familienmitglieder und deren Interaktionen innerhalb der Zelle reguliert. Um den Einfluss der Überexpression des BH3-only Proteins Noxa_S auf andere Bcl-2-Familienmitglieder überprüfen zu können, wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Andere Arbeitsgruppen wiesen nach, dass die Überexpression von Noxa_S den Abbau von Mcl-1 über das Proteasom fördert [Czabotar et al., 2007]. Unsere Ergebnisse zeigten hingegen, dass die Überexpression von Noxa_S nicht zur Abnahme von Mcl-1 im Vergleich zu Kontrollzellen führte (Abb. 24B). Auch für das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L konnte nach Überexpression von Noxa_S kein Unterschied im Expressionsprofil im Vergleich zu Kontrollzellen bzw. infizierten Zellen der off-Kondition detektiert werden. Das Expressionsniveau der pro-apoptotischen Proteine Bim_{EL}, Bim_L, Bim_S, Bcl-x_S und Bak wurde ebenfalls nicht durch die Überexpression von Noxa_S reguliert. Der Proteinspiegel des pro-apoptotischen Proteins Bax war nach Noxa_S-Expression im Vergleich zur off-Kondition bzw. Kontrolle deutlich verringert (Abb. 24B).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Überexpression des BH3-only Proteins Noxa_S Apoptose in Zervixkarzinomzellen induziert und dabei typische Charakteristika der Apoptose wie Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen, PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung auslöst.

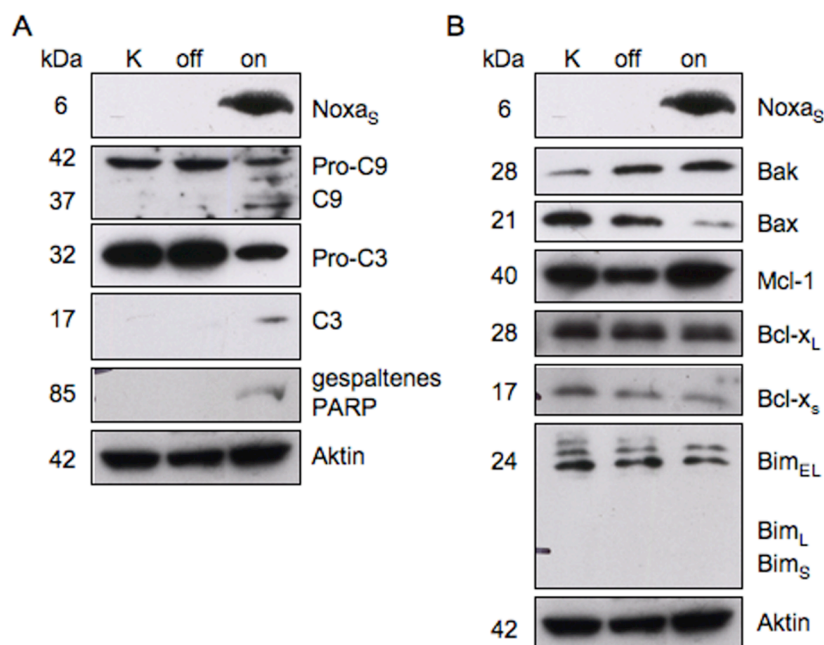


Abb. 24: Westernblotanalyse von HeLa Zellen nach Infektion mit AdNoxa_S

Unbehandelte (K) und mit 25 MOI AdNoxa_S infizierte HeLa Zellen wurden unter off- sowie on-Kondition 24 Stunden kultiviert. Die Proteinexpression wurde mittels ECL-Westernblot analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

A Aktivierung der Caspasekaskade. Die Expression von Procaspase-9 (Pro-C9), gespaltener Caspase-9 (C9), Procaspase-3 (Pro-C3), aktivierter Caspase-3 (C3), Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und Noxa_S wurde mit polyklonalen Antikörpern detektiert.

B Proteinexpression verschiedener Bcl-2-Familienmitglieder. Mcl-1, Bcl-x_{L/S}, Bax, Bak und Noxa_S verschiedene Bim-Spleißvarianten wurden mit polyklonalen Antikörpern detektiert.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist gezeigt.

5.5 Noxa-Spleißvarianten induzieren Apoptose in Prostatakarzinomzelllinien

Wie zuvor gezeigt, induziert die Überexpression des BH3-only Proteins Noxa_S in HeLa Zellen Apoptose. Welche Funktion Bax bzw. Bak im Zuge der Noxa_S-induzierten Apoptose haben, konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der BH3-only Proteine in der Aktivierung von Bax und/oder Bak resultiert, wodurch die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert und pro-apoptotische Faktoren in das Zytoplasma freigesetzt werden. Es wird kontrovers diskutiert, ob Bax und Bak redundant aktiviert werden bzw. wirken, oder ob sie spezifisch über bestimmte BH3-only Proteine oder anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder aktiviert bzw. reguliert werden. Gillissen et al. konnten zeigen, dass das BH3-only Protein Nbk Apoptose über einen ausschließlich Bax-abhängigen Mechanismus aktiviert [Gillissen et al., 2003]. Um den Wirkmechanismus von Noxa_S und Noxa_L in Bezug auf Bax und Bak vergleichend untersuchen zu können, wurde eine humane Prostatakarzinomzelllinie (DU145) verwendet, welche aufgrund einer Mutation im Leserahmen des Bax-Gens kein Bax exprimiert. Es standen verschiedene stabile Transfektanten zur Verfügung: zum einen mit einem Leervektor transfizierte DU145 mock Zellen und zum anderen Zellen mit Bax-Expression (DU145 Bax; Abb. 25).

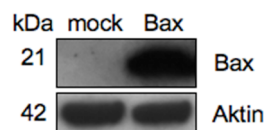


Abb. 25: Proteinexpressionsstatus von Bax in DU145 Zellen

Westernblotanalyse von Bax und Aktin in DU145 mock und DU145 Bax Zellen. Aktin fungierte als Ladekontrolle.

DU145 Zellen wurden mit 25 MOI AdNoxa_S bzw. AdNoxa_L infiziert und nach 72 Stunden die Apoptoserate bestimmt. DU145 mock und DU145 Bax Zellen der off-Kondition wiesen im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine Unterschiede in der Apoptoserate auf. 72 Stunden nach Expression von Noxa_S (on Kondition) zeigten hingegen ca. 55 % der mock Zellen und 50 % der Bax Zellen fragmentierte DNA (Abb. 26A). Zwischen beiden Zelllinien konnte somit nach Überexpression von Noxa_S kein Unterschied in der Apoptoserate beobachtet werden. Bak allein scheint im gleichen Maße wie Bax und Bak die Noxa_S-induzierte Apoptose vermitteln zu können.

Die Überexpression von Noxa_L, die in HeLa Zellen nicht zur Apoptose führte, resultierte hingegen in Prostatakarzinomzellen in Apoptose. Eine 72-stündige Expression von Noxa_L führte zu ca. 60 % hypodiploiden DU145 mock Zellen. Zudem zeigten auch ca. 50 % der DU145 Bax Zellen nach Überexpression von Noxa_L fragmentierte DNA (Abb. 26B). Es ist kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen mock und Bax Zellen zu erkennen, was darauf hinweist, dass das exprimierte Bak allein die Noxa_L-induzierte Apoptose in den DU145 mock Zellen vermitteln kann. Betrachtet man die Ergebnisse zum Noxa_S-induzierten Zelltod in Prostata-

karzinomzellen, so wird deutlich, dass die durch Noxa_L-induzierte Apoptoserate mit dieser vergleichbar ist. Somit besitzt auch Noxa_L apoptoseinduzierendes Potential in diesen Zellen.

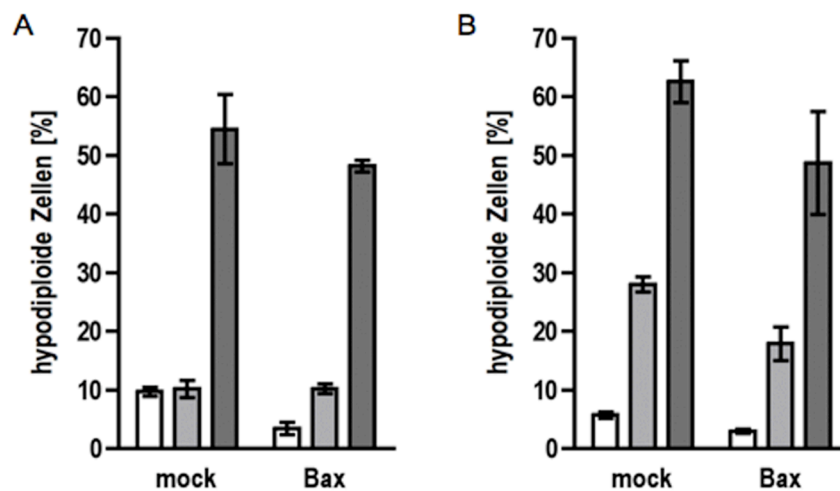


Abb. 26: Die Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L induziert Apoptose in DU145 mock und DU145 Bax Zellen

Dargestellt sind hypodiploide Zellen in % nach Infektion mit AdNoxa_S (A) bzw. AdNoxa_L (B). DU145 mock und DU145 Bax Zellen wurden infiziert, 72 Stunden inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind unbehandelte Zellen (weiße Balken), mit 25 MOI infizierte Zellen der off-Kondition (graue Balken) und on-Kondition (dunkelgraue Balken).

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

5.5.1 Pancaspaseinhibitor Q-VD-OPh hemmt die Noxa_S- bzw. Noxa_L-induzierte Apoptose

Um zu überprüfen, ob die Noxa_S- bzw. Noxa_L-induzierte Apoptose über Caspasen vermittelt wird, wurde der Pancaspaseinhibitor Q-VD-OPh verwendet. Dieser blockiert alle Caspasen, wodurch ICAD nicht von Caspase 3 gespalten wird, was zur Folge hat, dass die nukleäre DNA nicht von CAD fragmentiert werden kann [Enari et al., 1998].

Nach 72 Stunden wurde der Anteil an hypodiploiden Zellen in infizierten Zellen (off- und on-Kondition) sowie in infizierten Zellen mit paralleler Q-VD-OPh-Behandlung bestimmt. Die Überexpression von Noxa_S induzierte in 55 % der DU145 mock Zellen Apoptose, wobei die gleichzeitige Expression von Noxa_S und Behandlung mit Q-VD-OPh die Apoptose blockierte und nur noch 28 % der Zellen DNA-Fragmentierung zeigten (Abb. 27A). Die Noxa_S-induzierte Apoptose in DU145 mock Zellen konnte somit durch die Hemmung der Caspasen auf die Hälfte reduziert werden. Auch in DU145 Bax Zellen wurde die Noxa_S-induzierte Apoptose durch den Pancaspaseinhibitor blockiert und die Apoptoserate dadurch auf die Hälfte reduziert.

Die Noxa_L-Expression führte nach 72 Stunden in 63 % der DU145 mock Zellen zu hypodiploidem DNA-Gehalt (Abb. 27B). Eine Behandlung der mock Zellen mit Q-VD-OPh bei zeitgleicher Expression von Noxa_L hemmte die Apoptose zu 65 %. Betrachtet man die DU145 Bax Zellen 72 Stunden nach Noxa_L-Expression, so zeigten 50 % der DU145 Bax Zellen DNA-Fragmentierung. Wurden die Zellen aber parallel zur Noxa_L-Expression mit 10 µM Q-VD-OPh behandelt wiesen nur noch ca. 10 % der Zellen einen hypodiploiden DNA-Gehalt auf (Abb.

27B). Dies entspricht einer 80 %igen Hemmung. Die Apoptose konnte somit in Bax Zellen vollständig und in mock Zellen um mehr als die Hälfte durch den Pancaspaseinhibitor gehemmt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die Noxa_S- als auch die Noxa_L-induzierte Apoptose durch einen Pancaspaseinhibitor gehemmt werden kann. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Transfektanten festgestellt werden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Hemmung der Apoptose durch den Pancaspaseinhibitor unabhängig vom Bax-Expressionsstatus ist.

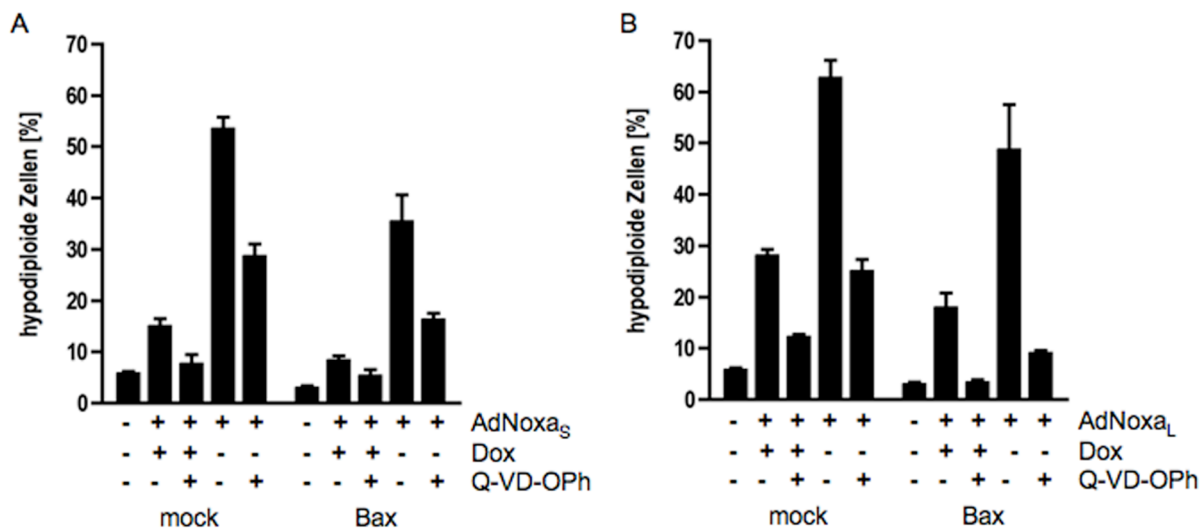


Abb. 27: Pancaspaseinhibitor hemmt die Noxa_S- bzw. Noxa_L-induzierte Apoptose in DU145 mock und DU145 Bax Zellen

Dargestellt sind hypodiploide Zellen in % nach Infektion mit AdNoxa_S (A) bzw. AdNoxa_L (B). DU145 mock Zellen und DU145 Bax Zellen wurden infiziert, mit 10 μ M Q-VD-OPh behandelt, 72 Stunden inkubiert und abschließend der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind unbehandelte Zellen, mit 25 MOI infizierte Zellen der off-Kondition und on-Kondition sowie jeweils mit bzw. ohne 10 μ M Q-VD-OPh. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten \pm Standardabweichung gezeigt.

5.5.2 Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Noxa_S- bzw. Noxa_L-Expression

Im Folgenden sollte der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nach Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L in Prostatakarzinomzellen, als wichtiges Kriterium der Apoptose, untersucht werden. Ca. 15-20 % der DU145 mock und Bax Zellen unter off-Kondition wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen ein reduziertes mitochondriales Membranpotential auf, was auf „Infektionsstress“ zurückgeführt werden kann (Abb. 28A und B). Nach 48-stündiger Überexpression von Noxa_S zeigten 60 % der DU145 mock Zellen und 43 % der DU145 Bax Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein reduziertes mitochondriales Membranpotential (Abb. 28A). Auch die Expression von Noxa_L führte in ca. 50 % der DU145 mock Zellen und in ca. 32 % der DU145 Bax Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 28B). Noxa_S- und Noxa_L-induzierter Zelltod in Prostatakarzinomzellen weist demnach ein weiteres Kennzeichen der Apoptose, den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, auf.

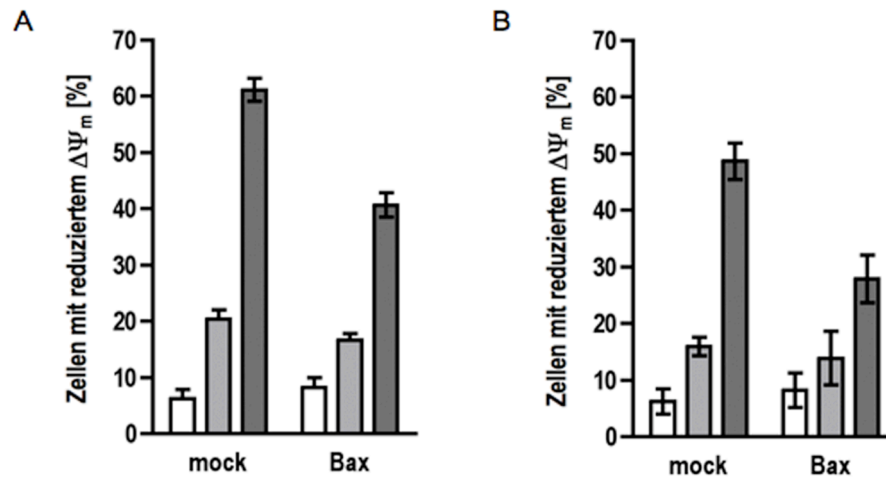


Abb. 28: Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials nach Expression von AdNoxa_S bzw. AdNoxa_L

48 Stunden nach Infektion mit AdNoxa_S (A) bzw. AdNoxa_L (B) wurden DU145 mock und DU145 Bax Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 gefärbt. Dargestellt sind Zellen mit reduziertem mitochondrialen Membranpotential in %, welche durchflusszytometrisch erfasst wurden: unbehandelte Zellen (weiße Balken), mit 25 MOI infizierte Zellen der off-Kondition (graue Balken) und on-Kondition (dunkelgraue Balken).

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten \pm Standardabweichung gezeigt.

5.5.3 Noxa_S und Noxa_L induzieren die Aktivierung von Bax und Bak

Die Relevanz von Bax und Bak im Zuge der Noxa_S- bzw. Noxa_L-induzierten Apoptose sollte nun weiter funktionell untersucht werden. Dazu wurde die Aktivierung von Bax und Bak analysiert. Bax und Bak führen zur Bildung von Oligomeren in der äußeren Mitochondrienmembran. Es entstehen Poren, über die proapoptotische Faktoren ins Zytosol gelangen. Die Aktivierung von Bax und Bak kann mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden, zum einen verwendeten wir für den N-Terminus spezifische Antikörper gegen Bax bzw. Bak, welche nur die aktivierte Form erkennen. Diese wurden mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert und abschließend durchflusszytometrisch erfasst und analysiert. Nach 24- bzw. 36-stündiger Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L konnte keine Aktivierung von Bax oder Bak nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Erst nach 48-stündiger Expression von Noxa_S wurde im Vergleich zu nicht infizierten Zellen und Zellen der off-Kondition in ca. 20 % der DU145 mock und DU145 Bax Zellen die Aktivierung von Bak nachgewiesen (Abb. 29A). In DU145 Bax Zellen zeigten zudem 25 % der Zellen nach Expression von Noxa_S Bax-Aktivierung. Die Überexpression von Noxa_L führte im Vergleich zu nicht infizierten Zellen und Zellen der off-Kondition in 25-30 % der DU145 mock Zellen zur Bak-Aktivierung. In ca. 18 % der DU145 Bax Zellen konnte nach Noxa_L-Expression die Aktivierung von Bax detektiert werden, allerdings war keine wesentliche Aktivierung von Bak zu messen (Abb. 29B).

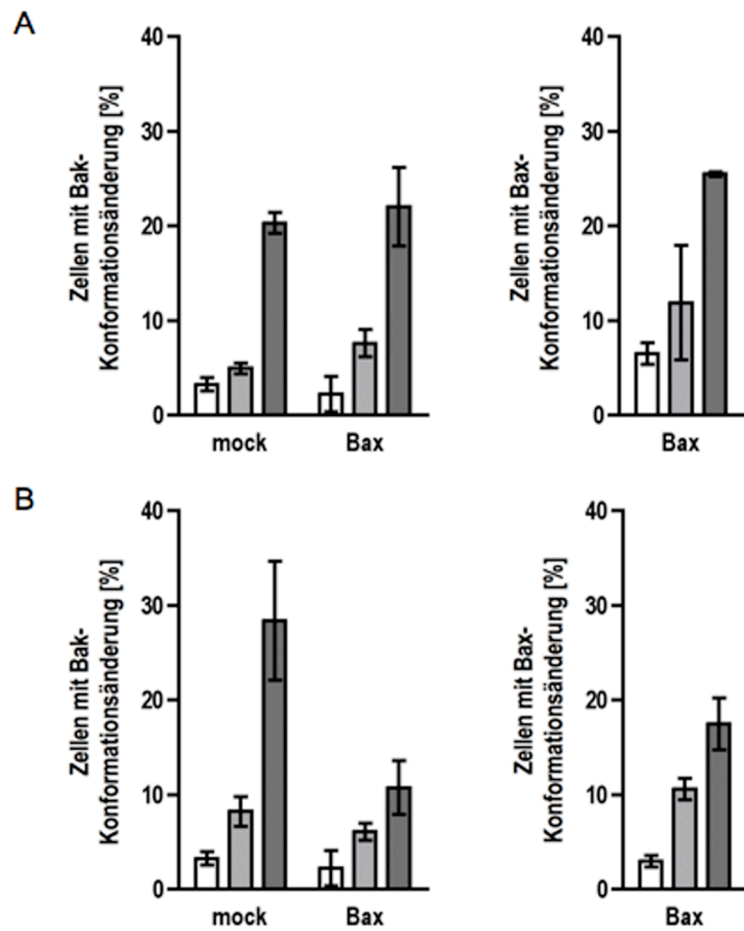


Abb. 29: Überexpression von Noxa_S bzw. Noxa_L führt zur Aktivierung von Bax und Bak

DU145 mock und DU145 Bax Zellen wurden mit 25 MOI AdNoxa_S (A) bzw. AdNoxa_L (B) infiziert und nach 48 Stunden mit einem Antikörper gegen Bax bzw. Bak inkubiert, welche das N-terminale Ende und damit die aktivierte Form von Bax bzw. Bak erkennt. Anschließend wurde mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Gezeigt sind Zellen mit Konformationsänderung von Bak bzw. Bax in %. Unbehandelte Zellen (weiße Balken), infizierte Zellen der off-Kondition (graue Balken) und on-Kondition (dunkelgraue Balken) sind dargestellt.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

Zum anderen wurden DU145 Zellen verwendet, die stabil EGFP-Bax bzw. EGFP-Bak exprimieren. Diese Fusionsproteine ermöglichen den Nachweis der Oligomerisierung von Bax bzw. Bak mikroskopisch anhand von Clusterbildung (Abb. 30). Unbehandelte DU145 EGFP-Bak Zellen (links) und Zellen der off-Kondition (mitte) zeigten das charakteristische Bild der tubulären Strukturen der Mitochondrien, was auf die typische Verteilung von Bak an den Mitochondrien schließen ließ (Abb. 30A). Eine 48-stündige Überexpression von Noxa_S (oben rechts) bzw. Noxa_L (unten rechts) führte zu einer punktierten, Färbung des EGFP-Bax Proteins was auf die Bildung von Bak-Clustern schließen ließ (Abb. 30A). Unbehandelte DU145 EGFP-Bax Zellen (links) und Zellen der off-Kondition (mitte) zeigten eine diffuse Fluoreszenz innerhalb der gesamten Zelle sowie zusätzlich eine tubulär strukturierte Fluoreszenz (Abb. 30B). Dies ist damit zu erklären, dass Bax sowohl im Zytosol (diffus) als auch an der Mitochondrienmembran (tubulär) lokalisiert ist. Etwa die Hälfte der Zellen wies nach 48 Stunden eine punktierte Färbung nach Überexpression von Noxa_S (oben rechts) bzw. Noxa_L (unten rechts) auf (Abb. 30B). Die Expression von Noxa_S und Noxa_L führte also zur Bildung von Bax-Clustern.

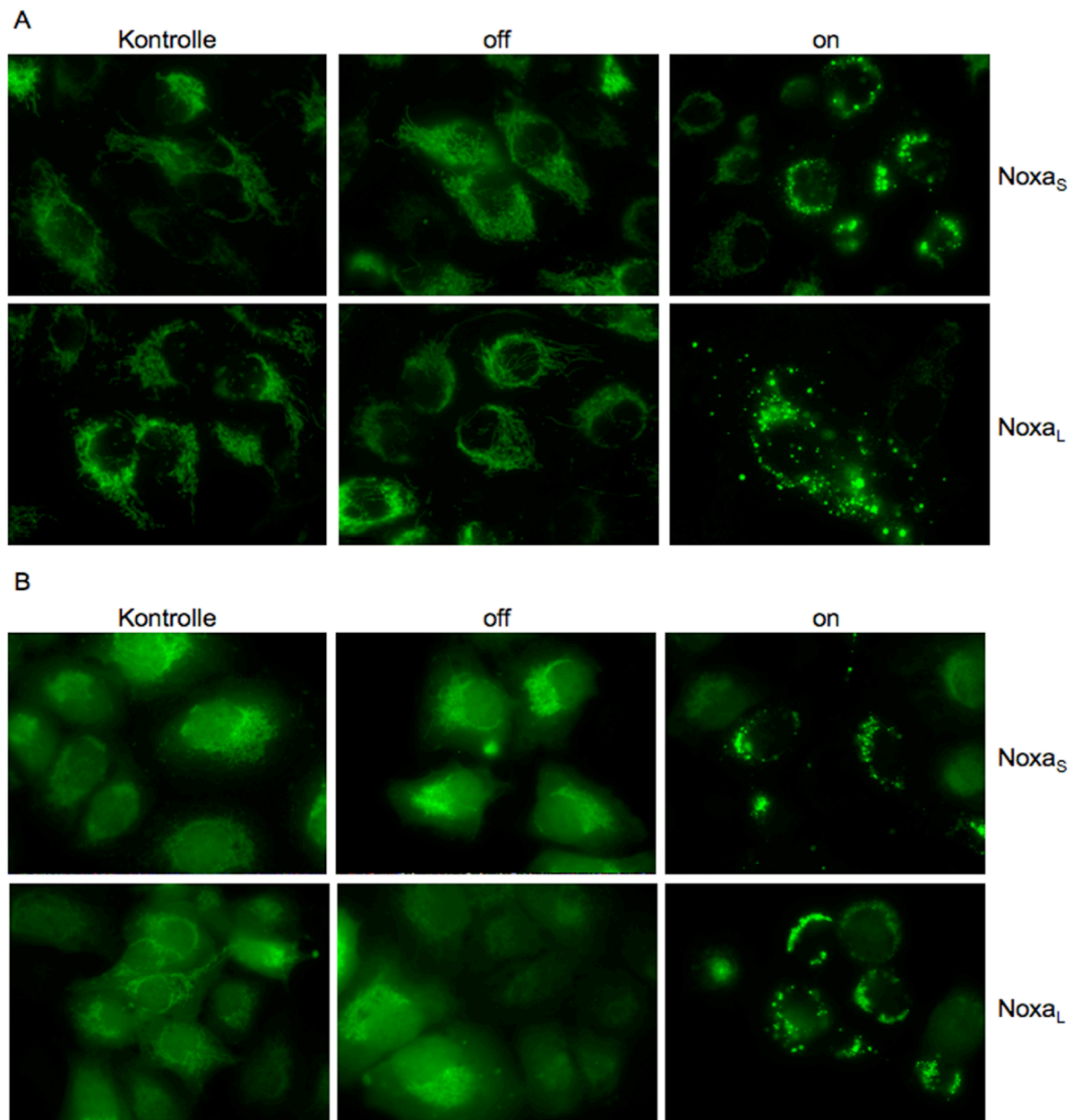


Abb. 30: Bax- und Bak-Clustering nach Infektion mit AdNoxa_S bzw. AdNoxa_L

DU145 EGFP-Bak (A) und DU145 EGFP-Bax (B) Zellen wurden mit 25 MOI Noxa_S bzw. Noxa_L infiziert. Nach 48 Stunden wurden repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten Zellen (Kontrolle), infizierten Zellen der off-Kondition (off) und on-Kondition (on) gemacht. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist gezeigt.

Die Überexpression von Noxa_S und Noxa_L führte in DU145 Prostatakarzinomzellen zur Aktivierung von Bax und Bak. Aufgrund dessen, dass DU145 mock und DU145 EGFP-Bak Zellen kein Bax exprimieren, kann man darauf schließen, dass die Aktivierung von Bak unabhängig von Bax erfolgt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung von Bax durch eine vorherige Aktivierung von Bak stimuliert wird (DU145 Bax Zellen und DU145 EGFP-Bax Zellen exprimieren endogenes Bak). Aufgrund dieser Ergebnisse kann man festhalten, dass die Expression von Noxa_S und auch die von Noxa_L in der Aktivierung von Bak und Bax resultiert, wobei unklar bleibt, ob die Aktivierung von Bax unabhängig von der Aktivierung von Bak erfolgt.

Sowohl Noxa_S als auch Noxa_L induzierten in DU145 Zellen DNA-Fragmentierung, welche durch Caspase-inhibitoren blockiert werden konnte, den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung von Bax und Bak, was auf Apoptose schließen lässt.

5.6 Noxa_S induziert Zelltod unabhängig von Bax und Bak in Kolonkarzinomzelllinien

Wie bereits erwähnt, wird kontrovers diskutiert, ob Bax und Bak redundant wirken, oder ob sie spezifisch über bestimmte BH3-only Proteine oder anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder aktiviert bzw. reguliert werden. Unsere Ergebnisse im DU145 Zellsystem haben gezeigt, dass sowohl Noxa_S als auch Noxa_L Bak unabhängig von Bax aktivieren konnte. Des Weiteren haben wir gezeigt, dass auch Bax nach Noxa_S- bzw. Noxa_L-Expression aktiviert wurde, ob dies unabhängig von Bak erfolgt ist noch ungewiss. Um den Zusammenhang zwischen Bax bzw. Bak und Noxa_S bzw. Noxa_L weiter zu untersuchen, wurden Bax Knockout (Bax-), Bak Knockdown (Bak-) und Bax Knockout Bak Knockdown (Bax-/Bak-) HCT116 Transfektanten verwendet. HCT116 Bax+/Bak+ Zellen exprimierten sowohl Bax als auch Bak. Bax- Zellen exprimierten hingegen nur Bak und Bak- Zellen nur Bax. Bax-/Bak- Zellen wiesen weder Bax- noch Bak-Expression auf (Abb. 31A).

Die Überexpression von Noxa_L induzierte im Gegensatz zu Noxa_S keine Apoptose in den verschiedenen HCT116 Zelllinien (Abb. 31C). Infizierte man HCT116 Bax+/Bak+ Zellen mit AdNoxa_S, so blieb die Apoptoserate unter off-Kondition auch nach 72 Stunden nahezu unverändert, vergleichbar mit unbehandelten Kontrollzellen. Auch in HCT116 Bax-/Bak-, HCT116 Bak- und HCT116 Bax- Zellen konnte unter off-Kondition keine wesentliche Zunahme der Apoptoserate festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen ca. 45 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen nach Expression von Noxa_S fragmentierte DNA auf (Abb. 31B). Bax- Zellen und Bax-/Bak- Zellen wiesen nach Überexpression von Noxa_S in etwa die gleiche Apoptoserate wie HCT116 Bax+/Bak+ Zellen auf (Abb. 31B). Demgegenüber wiesen ca. 65 % der HCT116 Bak- Zellen nach Noxa_S-Expression hypodiploiden DNA-Gehalt auf. Es wird somit deutlich, dass das BH3-only Protein Noxa_S unabhängig vom Expressionsstatus von Bax und Bak in HCT116 Zellen Zelltod induzierte, wobei berücksichtigt werden muss, dass es sich im Falle von Bak nicht um einen knock out sondern nur um einen knock down handelte.

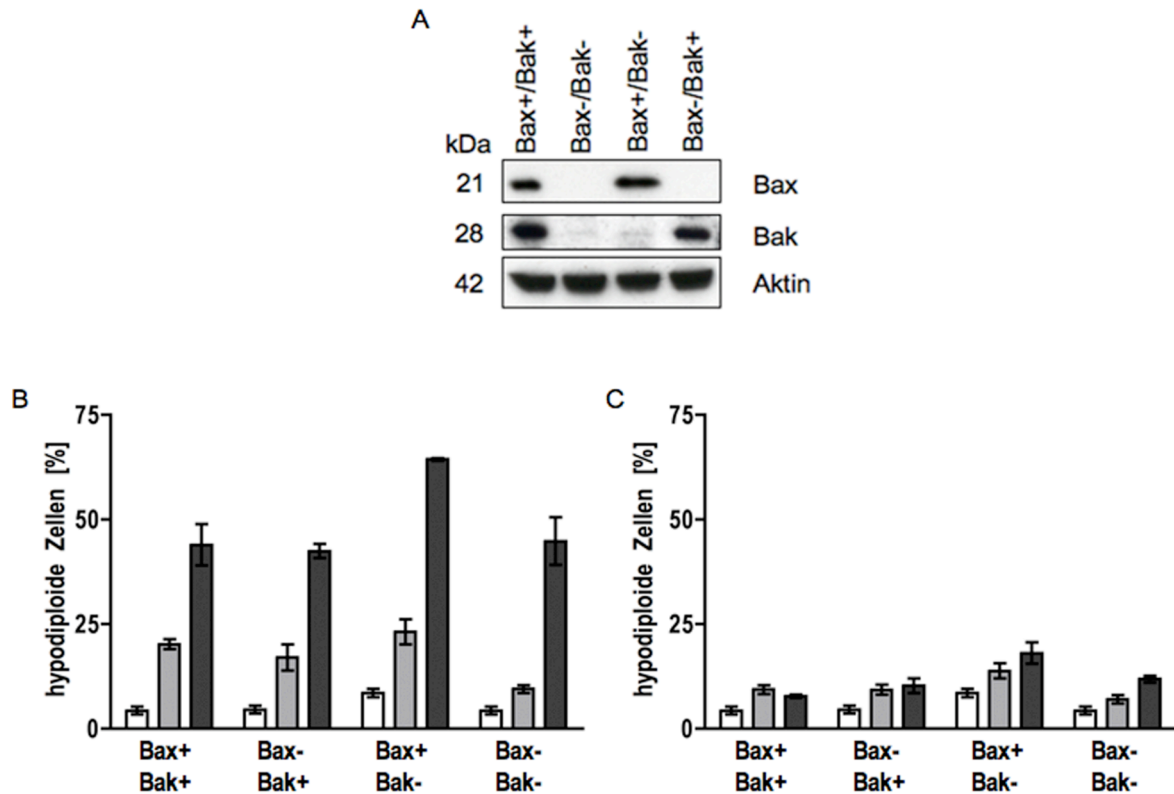


Abb. 31: Induktion von Apoptose nach Infektion mit AdNoxa_S in verschiedenen HCT116 Zelllinien

A Westernblotanalyse von Bax, Bak und Aktin in HCT116 Bax+/Bak+, Bax-, Bak- und Bax-/Bak- Zellen.

B/C Dargestellt sind hypodiploide (apoptotische) Zellen in % nach Infektion mit AdNoxa_S (*B*) bzw. AdNoxa_L (*C*). Die Zellen wurden infiziert, 72 Stunden inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind HCT116 Bax+/Bak+, Bax-, Bak- und Bax-/Bak- Zellen: unbehandelt (weiße Balken), mit 25 MOI AdNoxa_S infiziert off-Kondition (graue Balken) und on-Kondition (dunkelgraue Balken).

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

5.6.1 Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nach Noxa_S-Expression

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Überexpression von Noxa_S in HCT116 Zellen unabhängig von Bax und Bak in Apoptose resultierte. Kontrovers dazu sind die vorherigen Ergebnisse in DU145 Zellen, in denen wir nach Noxa_S-Expression sowohl die Aktivierung von Bax als auch von Bak nachweisen konnten. Zusätzlich zeigten verschiedene Veröffentlichungen, dass die Induktion von Apoptose durch BH3-only Proteine von Bax und Bak abhängig ist [Gillissen et al., 2003; Lindsten et al., 2000; Rathmell et al., 2002]. Um zu zeigen, dass es sich bei dem beobachteten Bax/Bak-unabhängigen Zelltod wirklich um Apoptose handelt, untersuchten wir, ob die Expression von Noxa_S unabhängig von Bax und Bak zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führte. 18 % der HCT116 Bax+/Bak+ und der HCT116 Bax-/Bak- Zellen unter off-Kondition wiesen nach 48 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein reduziertes mitochondriales Potential, welches mit „Infektionsstress“ begründet werden kann (Abb. 32). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wiesen nicht nur ca. 50 % der HCT116 Bax+/Bak+ Zellen, sondern auch 50 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen nach Noxa_S-

Expression ein reduziertes mitochondriales Potential auf. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Überexpression von Noxa_S Apoptose unabhängig von Bax und Bak induzieren kann.

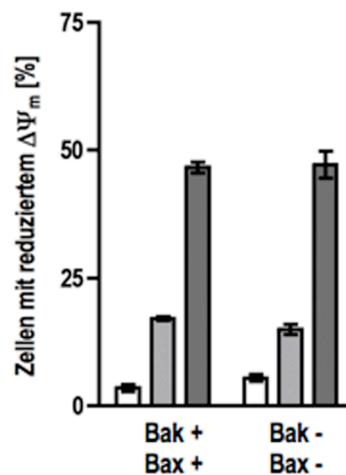


Abb. 32: Noxa_S induziert die Abnahme des mitochondrialen Membran-potentials

48 Stunden nach Infektion mit AdNoxa_S wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 gefärbt. Dargestellt sind Zellen mit reduziertem Mitochondrienmembranpotential in %, welche durchflusszytometrisch erfasst wurden. Gezeigt sind unbehandelte Zellen (weiße Balken), mit 25 MOI AdNoxa_S infizierte Zellen der off-Kondition (graue Balken) und infizierte Zellen der on-Kondition (dunkelgraue Balken). Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

5.6.2 Noxa_S induziert die Aktivierung von Caspasen

Bisher konnte gezeigt werden, dass der Noxa_S-induzierte Zelltod in DNA-Fragmentierung und dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials resultierte. Um zu analysieren, ob es sich wirklich um Apoptose und nicht um Autophagie handelt, wurde die Aktivierung der Caspasen, welche spezifisch für Apoptose ist, untersucht. Um die Aktivierung von Caspasen nach Noxa_S-Expression zu analysieren, wurden verschiedene Methoden benutzt. Zum einen wurden fluoreszenzmarkierte Inhibitoren der Caspase-3/-7 Aktivität (FAM-DEVD-FMK) verwendet, welche kovalent an einen Cysteinrest der großen aktiven Caspaseuntereinheit binden. Dies ermöglicht die durchflusszytometrische Messung von Zellen mit Caspaseaktivität. Zum anderen wurde die Abnahme der Procaspasen-9 und -3 auf Proteinebene untersucht. Im Zuge der Caspaseaktivierung werden die Proformen der Initiatorcaspasen autokatalytisch gespalten, die wiederum die Effektorcaspasen spalten (beides im Westernblot durch Abnahme sichtbar), wodurch die aktivierten Caspasen entstehen. HCT116 Bax+/Bak+ und HCT116 Bax-/Bak- Zellen wurden mit 25 MOI AdNoxa_S infiziert und nach 48-stündiger Inkubation die Effektorcaspaseaktivität bestimmt (Abb. 33A). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wiesen ca. 20-25 % der HCT116 Bax+/Bak+ und auch der HCT116 Bax-/Bak- Zellen der off-Kondition Caspase-3/-7 Aktivität auf. Demgegenüber zeigten ca. 50 % der wt und der Bax-/Bak- Zellen nach Überexpression von Noxa_S Caspase-3/-7 Aktivität, was darauf schließen ließ, dass Noxa_S die Aktivierung von Caspasen induziert. Auch auf Proteinebene ließ sich die Aktivierung der Caspasen nachweisen. Die Expression von Noxa_S (50 MOI) führte nach 48 Stunden in HCT116 Bax+/Bak+ Zellen im Vergleich zu Zellen der off-Kondition zu einer deutlichen Abnahme der Procaspase-9 und Procaspase-3 (Abb. 33B). Es konnte ebenfalls ein reduziertes Expressionsniveau der Procaspase-9 und Procaspase-3 48 Stunden nach Noxa_S-Expression (im Vergleich zur off-Kondition) in HCT116

Bax-/Bak- Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Noxa_S unabhängig von Bax und Bak Caspaseaktivierung induziert.

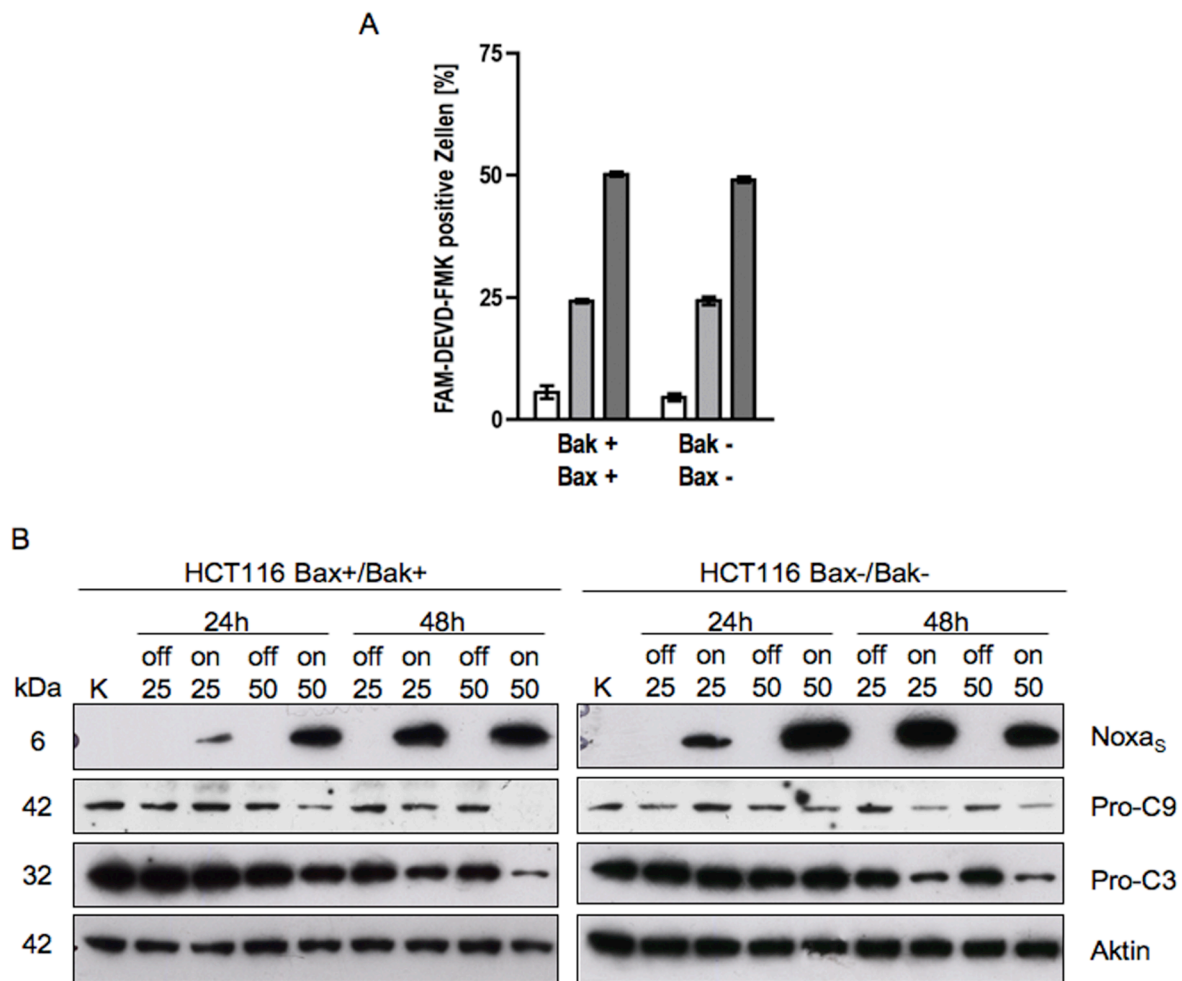


Abb. 33: Caspaseaktivierung nach Noxa_S-Expression

A HCT116 Bax+/Bak+ und HCT116 Bax-/Bak- Zellen wurden 48 Stunden nach AdNoxa_S-Infektion mit fluoreszenzmarkierten Inhibitoren der Caspaseaktivität inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch erfasst. Zellen mit aktivierten Caspasen fluoreszieren. Gezeigt sind unbehandelte Zellen (weiße Balken), mit 25 MOI infizierte Zellen der off-Kondition (graue Balken) und der on-Kondition (dunkelgraue Balken). FAM-DEVD-FMK positive Zellen sind in % dargestellt, welche Caspase-3/-7-aktivierten Zellen entsprechen. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

B HCT116 Bax+/Bak+ bzw. HCT116 Bax-/Bak- Zellen wurden mit 25 MOI bzw. 50 MOI infiziert und nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation unter off- bzw. on-Kondition geerntet. Unbehandelte Zellen (K) wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden lysiert und Westernblotanalysen durchgeführt. Die Expression von Procaspase-9 (Pro-C9), Procaspase-3 (Pro-C3), Noxa_S und Aktin wurde mit polyklonalen Antikörpern detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist gezeigt.

5.6.3 Ein Pancaspaseinhibitor hemmt die Noxa_S-induzierte Apoptose

Die vorherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Überexpression von Noxa_S zur Aktivierung von Caspasen führt. Um zu untersuchen, ob die aktivierten Caspasen im Zuge der Noxa_S-induzierten Apoptose wirklich relevant sind, wurde überprüft, ob die Noxa_S-induzierte Apoptose durch einen Pancaspaseinhibitor gehemmt

werden kann. Der Pancaspaseinhibitor Q-VD-OPH blockiert alle Caspasen, womit ICAD nicht von Caspase-3 gespalten werden kann und diese nicht aktiviert wird. Dadurch kann die nukleäre DNA nicht von CAD fragmentiert werden [Enari et al., 1998]. Durch den Einsatz von Caspaseinhibitoren ist die DNA-Fragmentierung somit in einem Caspase-abhängigen Prozess gehemmt. Sowohl HCT116 Bax+/Bak+ Zellen als auch HCT116 Bax-/Bak- Zellen der off-Kondition zeigten eine geringe Apoptoserate, welche bei gleichzeitiger Zugabe von 10 μ M Q-VD-OPH gehemmt wurde. Die Überexpression von Noxa_S führte in 53 % der wt Zellen zur Apoptose. Bei gleichzeitiger Noxa_S-Expression und Inkubation mit 10 μ M Q-VD-OPH ist die Apoptose der wt Zellen komplett gehemmt und entspricht der Grundapoptose in unbehandelten Zellen (Abb. 34). Auch 40 % der HCT116 Bax-/Bak- Zellen zeigten nach 72-stündiger Noxa_S-Expression DNA-Fragmentierung. Die Inkubation mit 10 μ M Q-VD-OPH in Noxa_S-überexprimierenden Bax-/Bak- Zellen blockierte die Noxa_S-induzierte Apoptose vollständig. Der Noxa_S-induzierte Zelltod kann somit durch Caspaseinhibitoren gehemmt werden. Dies bestätigt, dass Caspasen für den Noxa_S-induzierten Zelltod in Kolonkarzinomzellen notwendig sind.

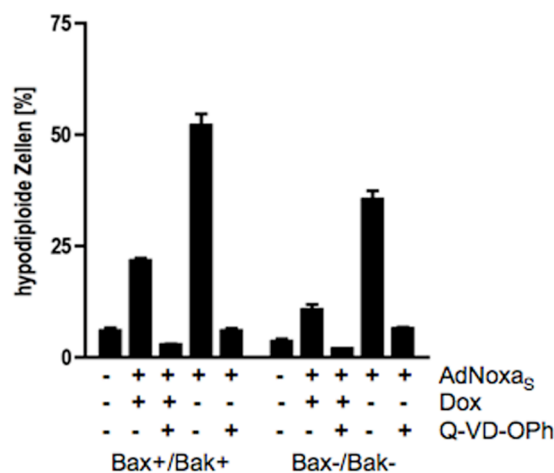


Abb. 34: Pancaspaseinhibitor Q-VD-OPH hemmt die Noxa_S-induzierte Apoptose

Dargestellt sind hypodiploide (apoptotische) Zellen in %. Die Zellen wurden infiziert, 72 Stunden inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Gezeigt sind HCT116 Bax+/Bak+ und Bax-/Bak- Zellen: unbehandelt (weiße Balken), mit 25 MOI AdNoxa_S infiziert off-Kondition (graue Balken) und on-Kondition (dunkelgraue Balken). Die Zugabe von 10 μ M Q-VD-OPH zu den entsprechenden Konditionen ist durch die Schraffierung der Balken verdeutlicht. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist mit Mittelwert von drei Messwerten +/- Standardabweichung gezeigt.

5.6.4 Regulation von Bcl-2 Familienmitgliedern nach Expression von Noxa

Verschiedene Veröffentlichungen haben gezeigt, dass Noxa_S über die Antagonisierung von Mcl-1 wirkt und dabei dessen Abbau vermittelt [Czabotar et al., 2007; Willis et al., 2005]. Um den Einfluss des BH3-only Proteins Noxa_S auf Bcl-2-Familienmitglieder in Kolonkarzinomzellen überprüfen zu können, wurden nach Überexpression von Noxa_S Westernblotanalysen durchgeführt. Das Expressionsprofil der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1, Bcl-2 und Bcl-x_L wies keine Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen (unbehandelt (K), off, on) in HCT116 Bax+/Bak+ Zellen auf. Dies konnte für Mcl-1 und Bcl-2 auch in HCT116 Bax-/Bak- Zellen gezeigt werden (Abb. 35). Somit führte die Überexpression von Noxa_S nicht zur Abnahme von Mcl-1. Dies stimmt mit den in HeLa gezeigten Ergebnissen überein. Bcl-x_L war in HCT116 Bax-/Bak- Zellen nach 48 Stunden unter on-Kondition geringer exprimiert als unter off-Kondition. Außerdem führte die Überexpression

von Noxa_S nach 48 Stunden in HCT116 Bax⁺/Bak⁺ Zellen im Vergleich zur off-Kondition zur Abnahme des pro-apoptotischen Proteins Bax. Zusätzlich konnte auch das p18 Spaltprodukt von Bax, welches im Zuge der späten Apoptose auftritt, detektiert werden. Das Expressionsniveau des pro-apoptotischen Multidomänenproteins Bak wurde in HCT116 Bax⁺/Bak⁺ Zellen nicht reguliert. In HCT116 Bax⁻/Bak⁻ Zellen konnte, wie erwartet, keine Expression von Bax und Bak nachgewiesen werden. Die Überexpression des BH3-only Proteins Noxa_S reguliert nur das Expressionsniveau von Bax in HCT116 Bax⁺/Bak⁺ Zellen herunter.

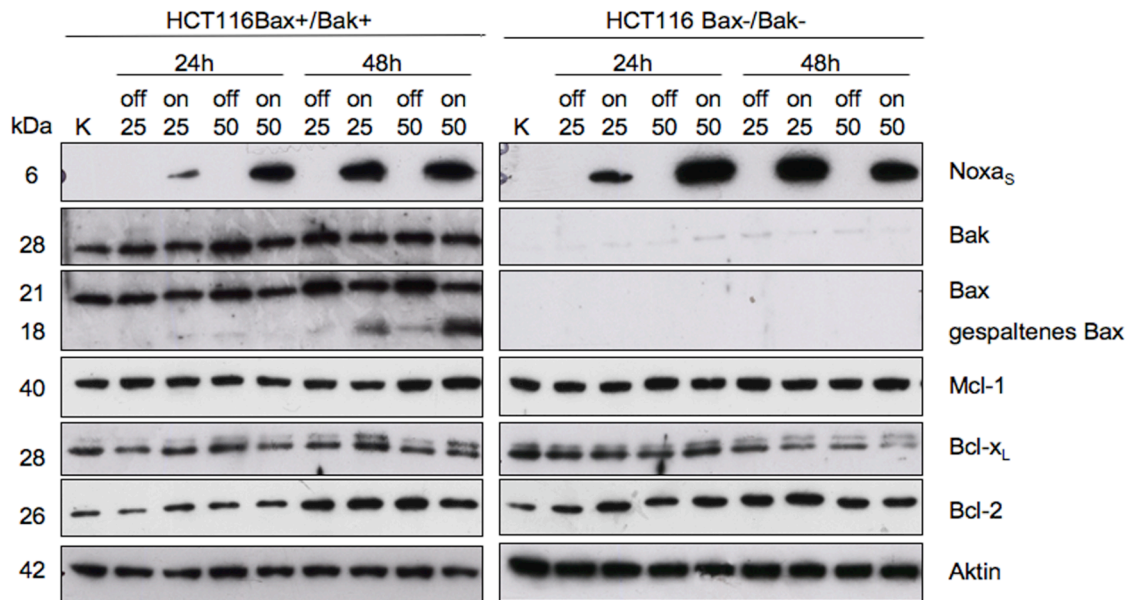


Abb. 35: Proteinexpression verschiedener Bcl-2-Familienmitglieder nach AdNoxa_S-Infektion
HCT116 Bax⁺/Bak⁺ bzw. HCT116 Bax⁻/Bak⁻ Zellen wurden mit 25 MOI bzw. 50 MOI infiziert und nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation unter off- bzw. on-Kondition geerntet. Die Zellen wurden lysiert und Westernblotanalysen durchgeführt. Die Expression von Mcl-1, Bcl-x_L, Bax, Bak, Noxa_S und Aktin wurde mit polyklonalen Antikörpern und Bcl-2 mit einem monoklonalen Ak detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Es ist jeweils ein Beispiel gezeigt.

5.7 Lokalisation von Noxa_L

Es ist bekannt, dass das BH3-only Protein Noxa_S an den Mitochondrien lokalisiert und diese Lokalisation entscheidend für die Fähigkeit der Apoptoseinduktion ist [Oda et al., 2000; Seo et al., 2003]. Im Gegensatz dazu, ist die Lokalisation von Noxa_L noch völlig ungeklärt. Die Ergebnisse in DU145 Zellen haben gezeigt, dass auch Noxa_L Apoptose induzieren kann, weshalb sich die Frage stellt, ob auch Noxa_L an den Mitochondrien lokalisiert ist und möglicherweise von dort Apoptose induziert. Um die Lokalisation von Noxa_L mittels konfokaler Mikroskopie zu untersuchen wurden HeLa Zellen mit 25 MOI AdNoxa_L infiziert und nach 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit einem Tom20- (Translocase der äußeren Mitochondrienmembran) Antikörper und Noxa_S mit einem Myc-Antikörper detektiert. Der Nachweis der DNA erfolgte mittels Höchst 33258-Färbung.

24 Stunden nach Inkubation der HeLa Zellen unter off-Kondition war keine Myc-Färbung nachweisbar (Abb. 36, 1. Reihe). Im Gegensatz dazu waren unter on-Kondition nach Myc-Färbung viele kleine grüne Punkte innerhalb der Zelle zu beobachten (Abb. 36, 2. , 3. Reihe, 1. Bild), was auf die Expression von Noxa_L schließen ließ. Zellen der off-Kondition zeigten nach Färbung der Mitochondrien mit einem Tom20-Antikörper das

charakteristische Bild der tubulären mitochondrialen Strukturen (Abb. 36, 1. Reihe, 2. Bild), was der Aufnahme von unbehandelten Zellen entsprach (Bilder nicht gezeigt). Zellen der on-Kondition dagegen wiesen eine punktförmige mitochondriale Färbung auf (Abb. 36, 2., 3. Reihe 2. Bild). Im Zuge der Apoptose werden Mitochondrien fragmentiert [Youle und Karbowski, 2005]. Die punktierte Färbung der Mitochondrien zeigt somit, dass die Expression von Noxa_L zur Fragmentierung von Mitochondrien führte. Im Overlay wurde deutlich, dass die Myc-Färbung und die Färbung der Mitochondrien überlappen, was darauf schließen ließ, dass Noxa_L an den Mitochondrien lokalisiert ist (Abb. 36, 2., 3. Reihe). Betrachtet man den Overlay der Abb. 36, 3. Reihe genauer, so wird deutlich, dass die grüne punktierte Myc-Färbung nicht nur mit der roten Färbung der Mitochondrien überlagert ist, sondern auch mit der blauen Kernfärbung. Dies weist darauf hin, dass Noxa_L nicht nur an den Mitochondrien, sondern zusätzlich auch im Nukleus lokalisiert ist. Dieses Verteilungsmuster von Noxa_L innerhalb der Zelle war in verschiedenen Zellen immer wieder zu beobachten. So zeigten manche Zellen eine ausschließlich mitochondriale Lokalisation und andere Zellen zeigten sowohl mitochondriale als auch nukleäre Lokalisation.

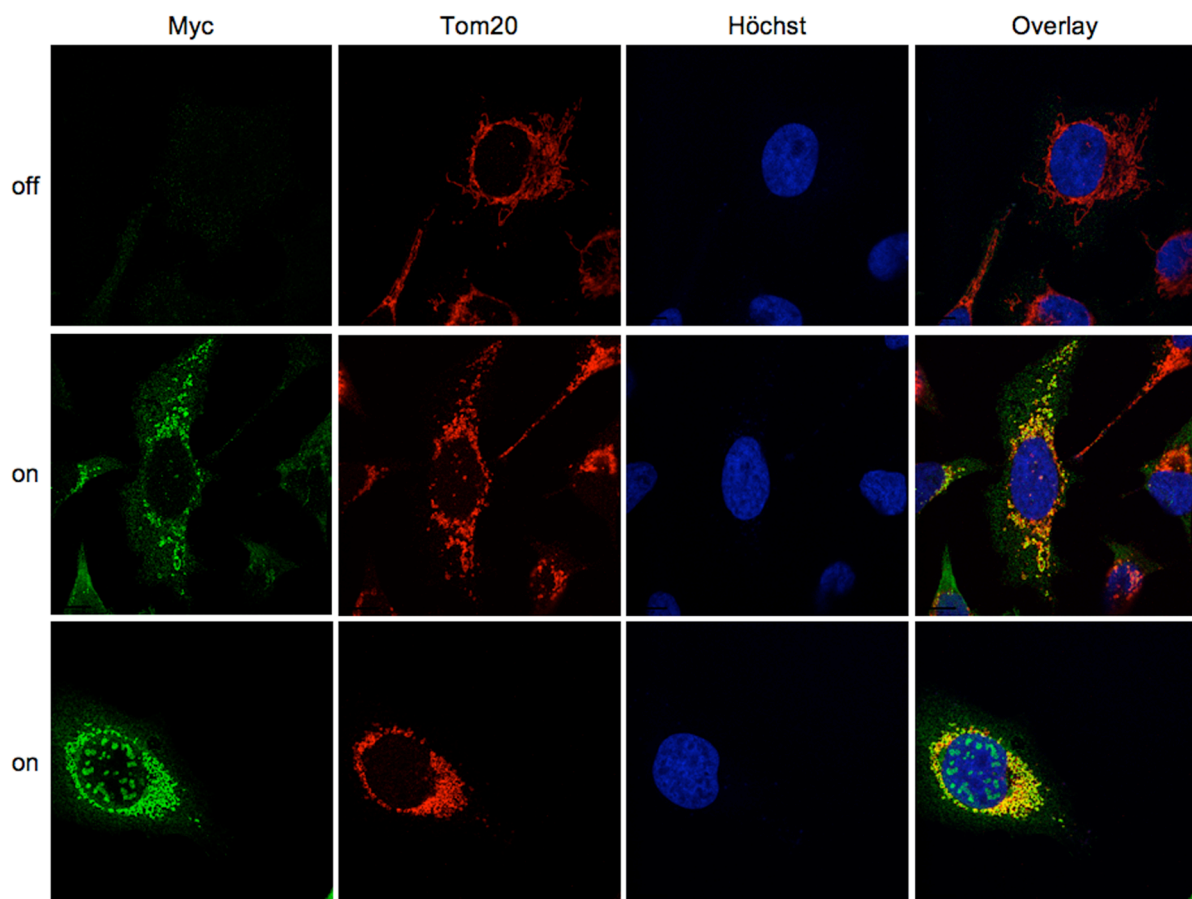


Abb. 36: subzelluläre Lokalisation von Noxa_L

HeLa Zellen wurden mit 25 MOI AdNoxa_L infiziert, 24 Stunden unter off- bzw. on-Kondition inkubiert und anschließend fixiert. Noxa_S wurde mit einem Myc-Antikörper (sekundärer Ak: Alexa Fluor 488), die Mitochondrien wurden mit einem Tom20-Antikörper (sekundärer Ak: Alexa Fluor 568) und die DNA mittels Höchst 33258-Färbungsfärbung nachgewiesen. Gezeigt sind konfokale, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 (linke Bildreihe), 561 (2. Bildreihe von links) bzw. 405 (3. Bildreihe von links) und der Overlay der einzelnen Fluoreszenzbilder. Beispiele der off-Kondition und on-Kondition sind abgebildet. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Jeweils ein Beispiel ist gezeigt.

6 Diskussion

6.1 Induktion von Zelltod durch Bcl-2 Inhibitoren

Moderne Antikrebsstrategien wenden sich von nichtspezifischen zytotoxischen Agenzien ab hin zu der Anwendung von rational entwickelten Medikamenten, welche wohldefinierte Ziele in spezifischen Signalwegen der Tumorgenese angreifen. Dieser Ansatz wird als „zielgerichtete Tumorthherapie“ bezeichnet. Eine Schlüsselhypothese ist dabei, dass die Inaktivierung von Zelltodsignalwegen entscheidend zur Entstehung und Persistenz von Tumoren beiträgt. Die Überexpression von anti-apoptotischen oder der Verlust von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie wird in vielen verschiedenen Tumortypen beobachtet und mit verlängertem Zellüberleben sowie Therapieresistenz in Verbindung gebracht [Chanan-Khan, 2005; Osford et al., 2004; Sturm et al., 1999; Sturm et al., 2001; Sturm et al., 2006]. Cisplatin und Taxol sind in der Antikrebstherapie verwendete, konventionelle Zytostatika. Sie induzieren Zelltod über den intrinsischen Signalweg, indem sie DNA- und Proteinaddukte erzeugen (Cisplatin) bzw. die Ausbildung mitotischer Spindeln blockieren (Taxane) und dadurch zelluläre Stressprogramme aktivieren, die sekundär Zelltod induzieren [Barabas et al., 2008; Jordan und Kamath, 2007].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 bzw. Bcl-x_L die Taxol- bzw. Cisplatin-induzierte Apoptose in verschiedenen Tumorzellen hemmt. Die verwendeten Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-überexprimierenden Tumorzellen sind also resistent gegen die Zytostatika-induzierte Apoptose. Die Resistenz ist dadurch zu erklären, dass der intrinsische Signalweg durch die Bcl-2 Familie reguliert wird und hohe anti-apoptotische Bcl-x_L oder Bcl-2 Proteinspiegel das Verhältnis der Bcl-2 Familienmitglieder in Richtung „Überleben“ verschieben. Aus diesem Grund werden Bcl-2 und Bcl-x_L seit den 1990er Jahren als Ziele für Antikrebstherapien untersucht [Juin et al., 2004]. Bisher wurden verschiedene Ansätze gewählt, um dieser Überexpression gezielt entgegen zu wirken und somit Therapie-resistente Tumore für Apoptose, im engeren Sinne für den intrinsischen Signalweg, zu sensitivieren. Ein Ansatz besteht in der Verwendung von Nuklease-resistenten Antisense-Oligonukleotiden wie Oblimersen (Genasense) [Banerjee, 2001], welches die ersten sechs Kodons der *bcl-2* mRNA bindet und somit die Bildung von Bcl-2 blockiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass es für die Behandlung von verschiedenen Tumoren geeignet ist [Rudin et al., 2004]. Dreidimensionale Proteinstrukturstudien von Bcl-2 und Bcl-x_L haben ergeben, dass die Domänen BH1-3 eine hydrophobe Furche an der Oberfläche der Proteine bilden [Petros et al., 2001; Sattler et al., 1997]. Diese Tasche spielt eine entscheidende Rolle bei der inhibitorischen Bindung von pro-apoptotischen Familienmitgliedern. Eine innovative Strategie ist daher die direkte Antagonisierung von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L durch niedermolekulare Substanzen, welche den entscheidenden Vorteil gegenüber BH3-Peptiden haben, dass sie besser zellpermeabel und im Zellinneren stabiler sind. In den letzten Jahren wurden zum einen verschiedene synthetische Substanzen wie ABT737 [Oltersdorf et al., 2005], ABT263 [Tse et al., 2008] oder Obatoclax (GeminX) [Trudel et al., 2007] und zum anderen eine Vielzahl von natürlichen Substanzen als potentielle Inhibitoren von Bcl-2 identifiziert. Die meisten natürlichen Moleküle identifizierte man ursprünglich durch Methoden, die auf die Struktur oder Funktion der BH3-Bindungsstelle fokussiert waren. So wurden einige durch *in silico* Substanzsuchen und andere durch Hochdurchsatz-Fluoreszenzpolarisationsverfahren entdeckt. Aufgrund ihrer Eigenschaft, BH3-Peptide aus der hydrophoben Furche zu verdrängen, bezeichnet man sie auch als Bcl-2 Inhibitoren oder BH3-Mimetika. In dieser Arbeit wurden die drei vielversprechenden natürlichen Bcl-2 Antagonisten Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' und deren Wirkmechanismen untersucht.

6.1.1 BH3-Mimetika induzieren Zelltod unabhängig vom Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-Expressionsstatus

2003 konnte erstmals durch Kitada et al. gezeigt werden, dass das Polyphenol Gossypol an Bcl-x_L bindet und dadurch *in vitro* Caspase-abhängigen Zelltod auslöst [Kitada et al., 2003]. Die Überexpression von Bcl-x_L führte zur Hemmung der Apoptose, wobei der protektive Effekt von Bcl-x_L durch höhere Dosen (100 µM) Gossypol überwunden werden konnte. Diese Ergebnisse führten dazu, dass Gossypol als Bcl-2 Inhibitor vorgeschlagen wurde. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Behandlung von verschiedenen Tumorzelllinien mit dem putativen Bcl-2 Inhibitor Gossypol zur dosisabhängigen Induktion von Apoptose führte. Allerdings konnten wir im verwendeten Konzentrationsbereich von 0-50 µM Gossypol keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-überexprimierenden Tumorzellen und Tumorzellen mit geringem Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-Expressionsspiegel feststellen. Die Funktionalität der überexprimierten Proteine Bcl-2 bzw. Bcl-x_L wurde zuvor durch die Apoptoseresistenz der überexprimierenden Zellen gegen verschiedene Zytostatika gezeigt. Gossypol überwand also im untersuchten Konzentrationsbereich die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 in verschiedenen Tumorzelllinien. Einerseits kann Gossypol also Bcl-2 und Bcl-x_L vermittelte Apoptoseresistenzen überwinden. Andererseits ist die hohe Rate an Apoptoseinduktion in den Zelllinien mit geringer Expression von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L verblüffend. Ein „off-target“-Effekt könnte diese erklären.

HA14-1 wurde als weiterer putativer Bcl-2 Inhibitor in diesem Zusammenhang untersucht. Wang et al. beschrieben HA14-1 als eine kleine organische Substanz, die an Bcl-x_L binden kann, in HL60 Zellen Apoptose auslöst und dabei charakteristische Merkmale wie DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und Caspaseaktivierung induziert [Wang et al., 2000]. Der Proteinexpressionsstatus von Bcl-x_L wurde in dieser Studie nicht untersucht. Wie Gossypol wurde auch HA14-1 aufgrund der beschriebenen Ergebnisse als Bcl-2 Inhibitor eingestuft. Wir konnten die Induktion von Apoptose durch HA14-1 in verschiedenen Tumorzellen nachweisen, zusätzlich aber auch, dass diese unabhängig vom Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-Proteinexpressionsstatus erfolgte. Die Überwindung der „prosurvival“-Wirkung von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 durch die Behandlung von verschiedenen Tumorzellen mit HA14-1 konnte somit eindeutig nachgewiesen werden. In Analogie zu den Ergebnissen von Gossypol könnte die Wirkung aber auch mit einem Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-unabhängigen Mechanismus in Verbindung stehen.

Darüber hinaus analysierten wir den Wirkmechanismus des putativen Bcl-2 Inhibitors BH3I-2'. Degterev et al. identifizierten BH3I-2' durch Fluoreszenzpolarisationsverfahren. Diese niedermolekulare Substanz verdrängt BH3-Peptide aus der Bindung an anti-apoptotische Bcl-2 Proteine und induziert Apoptose in Jurkat Zellen über den mitochondrialen Signalweg mit charakteristischen Merkmalen wie DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und Aktivierung von Caspase-9 und -3 [Degterev et al., 2001]. Des Weiteren konnten sie mittels FRET-Analysen zeigen, dass BH3I-2' die Heterodimerisierung von Bcl-2 und Bax in intakten Zellen zerstört und dass die Überexpression von Bcl-x_L in Jurkat Zellen den zytotoxischen Effekt von BH3I-2' schwächt. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass BH3I-2' dosisabhängig Apoptose in verschiedenen Zellsystemen induziert und eine Überexpression von Bcl-x_L oder Bcl-2 diese leicht hemmt. Aus theoretischer Sicht sollte ein Bcl-2 Inhibitor wie BH3I-2' in der Lage sein, den protektiven Effekt von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 durch direkte Antagonisierung zu überwinden. Da BH3I-2' den zytoprotektiven Einfluss von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L nur bedingt überwinden kann, eignet es sich jedoch nur eingeschränkt zur Behandlung von Bcl-2- oder Bcl-x_L-überexprimierenden Tumoren.

Der protektive Mechanismus von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 beruht darauf, dass in Zellen, die Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-überexprimieren, das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen in Richtung der anti-apoptotischen Proteine verschoben ist (Rheostat-Modell) und solche Zellen somit vor Apoptose geschützt sind [Korsmeyer et al., 1993]. Anti-apoptotische Bcl-2 Proteine binden hierbei an BH3-only Proteine bzw. sequestrieren aktiviertes Bax und Bak [Wong und Puthalakath, 2008]. Eine Bindung von BH3-Mimetika würden somit die verfügbaren Spiegel an freien BH3-only Proteinen erhöhen sowie gleichzeitig mehr aktiviertes Bax und Bak bereitstellen. Die Induktion von Apoptose durch die Behandlung mit Gossypol, HA14-1 oder zum Teil auch BH3I-2' in Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-überexprimierenden Tumorzellen kann also damit begründet werden, dass Bcl-2 Inhibitoren an Bcl-2 bzw. Bcl-x_L binden und dadurch das Verhältnis in Richtung pro-apoptotische Proteine verschieben, da das anti-apoptotische Signal neutralisiert und somit deren protektiver Effekt überwunden wird. Unsere Ergebnisse haben aber auch gezeigt, dass die putativen Bcl-2 Inhibitoren Apoptose in Tumorzellen mit geringem (teilweise unterhalb der Proteinnachweisgrenze) Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-Expressionsstatus induzieren. Dies führt zu der Frage worauf der zytotoxische Effekt beruht, wenn nicht auf der Verschiebung des Verhältnisses von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen in Richtung der pro-apoptotischen Proteine. Es scheint unwahrscheinlich, dass die putativen Bcl-2 Inhibitoren das Verhältnis direkt oder selbst in Richtung pro-apoptotische Proteine verschieben oder deren Anteil erhöhen können. Die Vorschläge, sowohl Gossypol, HA14-1 als auch BH3I-2' als Bcl-2 Inhibitoren einzuordnen, ist somit möglicherweise nicht sinnvoll, da es einen anderen Wirkmechanismus als die direkte Bcl-2 Antagonisierung zu geben scheint. Die Fähigkeit von Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' (zum Teil) in Bcl-2- bzw. Bcl-x_L-überexprimierenden Tumorzellen Apoptose auszulösen sollte aber dennoch beachtet werden, da verschiedene Antikrebstherapeutika wie Cisplatin oder Taxol an dieser Stelle versagen.

Neben Bcl-2 und Bcl-x_L gibt es weitere prominente anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder wie Mcl-1 oder Bcl-w. Es ist bekannt, dass Mcl-1 nicht wie Bcl-2 oder Bcl-x_L Bax antagonisiert, sondern bevorzugt Bak [Chen et al., 2005; Willis et al., 2005; Willis et al., 2007]. Möglicherweise wirken Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' unabhängig von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L aber abhängig von Mcl-1 oder Bcl-w, durch Antagonisierung dieser, was weitere Untersuchungen nötig macht. Einen derartigen Wirkmechanismus können wir zumindest für eines der verwendeten Zellsysteme dieser Arbeit weitgehend ausschließen, da HCT116 Zellen die Proteine Mcl-1 und Bcl-w in nur geringen Mengen exprimieren.

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass BH3I-2' TRAIL- oder CD95/Fas-resistente Tumorzellen für Apoptose sensitiviert [Hao et al., 2004; Ray et al., 2005]. Zellen die resistent für die Induktion von Apoptose über den extrinsischen Signalweg sind, können also durch die Behandlung mit niedermolekularen Substanzen wie BH3I-2', Gossypol oder auch HA14-1 für den intrinsischen Signalweg sensitiviert werden.

Der Mechanismus der Aktivierung des intrinsischen Signalwegs durch BH3I-2', Gossypol und HA14-1 bleibt aber unverstanden. Die Fähigkeit von Gossypol, HA14-1 und zum Teil auch BH3I-2' Apoptose unabhängig von Bcl-x_L und Bcl-2 zu induzieren, führte zu der Frage, ob die Wirkung dieser Substanzen spezifisch über die Bcl-2 Familie erfolgt und wird im Folgenden diskutiert.

6.1.2 „off-target“-Effekte putativer Bcl-2 Inhibitoren

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Induktion von Apoptose durch die untersuchten putativen Bcl-2 Inhibitoren sowohl in Tumorzellen mit geringem Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-Proteinexpressionsniveau als auch in Bcl-x_L- bzw. Bcl-2-überexprimierenden Tumorzellen erfolgte. Es erscheint daher fraglich, ob die hier untersuchten putativen Bcl-2 Inhibitoren Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' spezifisch über anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder wirken. Sollte dies der Fall sein, kann die Induktion der Apoptose nicht ohne Bax und Bak erfolgen. Die Aktivierung von Bax und Bak führt zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien, die wiederum zur Aktivierung der Caspasekaskade und damit zur Exekution der Zelle führt. Ohne Aktivierung dieser übergeordneten Signale ist die Apoptoseinitiation unterbrochen.

Unsere Untersuchungen dazu haben gezeigt, dass Gossypol, HA14-1 und zum Teil auch BH3I-2' Zelltod unabhängig von Bax und Bak in HCT116 Zellen induzierten. Sowohl Bax/Bak-profiziente als auch Bax/Bak-defiziente Zellen zeigten nach Behandlung mit den verschiedenen niedermolekularen Substanzen DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung von Caspasen. All dies sind charakteristische Merkmale der Apoptose, die darauf hinweisen, dass Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' Apoptose unabhängig von Bax und Bak induzieren. Die putativen Bcl-2 Inhibitoren Gossypol, HA14-1 und , zum Teil, BH3I-2' wirken somit nicht nur unabhängig von dem Expressionsniveau der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L, sondern auch unabhängig von den pro-apoptotischen Proteinen Bax und Bak. Der zytotoxische Effekt von Gossypol und HA14-1 ist daher unabhängig von der Bcl-2 Familie und kann als „off-target“-Effekt bezeichnet werden, da nicht Bcl-2 Proteine das eigentliche Ziel sind, sondern ein noch unverstandener Bcl-2-unabhängiger Mechanismus. Der für Gossypol und HA14-1 vorgeschlagene Wirkmechanismus als Bcl-2 Inhibitor scheint also unwahrscheinlich. Hingegen zeigt BH3I-2' sowohl Bcl-2-Familien-abhängige als auch Bcl-2-Familien-unabhängige Effekte.

Im Gegensatz zu den verwendeten putativen Bcl-2 Inhibitoren bzw. BH3-Mimetika zeigen durch kombinatorische Chemie und 3D-Modellierung entworfene BH3-Mimetika wie ABT-737 keine Induktion von Apoptose in Bax/Bak-defizienten Zellen [Oltersdorf et al., 2005; van Delft et al., 2006]. Außerdem scheinen solche BH3-Mimentika spezifische Bindungsaffinitäten, ähnlich denen der BH3-only Proteine, aufzuweisen. So konnte in Verdrängungsversuchen gezeigt werden, dass ABT-737 ein spezifisches Bindungsmuster aufweist und nur an Bcl-2, Bcl-x_L bzw. Bcl-w bindet, nicht aber an Mcl-1 [van Delft et al., 2006]. Aufgrund dessen wird ABT-737 als Bad-ähnliches BH3-Mimetikum bezeichnet.

Wie bereits erwähnt, wird der intrinsische Apoptosesignalweg über die Bcl-2 Familie reguliert und kontrolliert. Die Aktivierung der Mitochondrien nimmt dabei eine zentrale Funktion ein, die, nach heutigem Wissensstand, nicht ohne Bax und Bak erfolgen kann [Lindsten et al., 2000]. Somit sind die Erkenntnisse, dass Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' (zum Teil) Bax/Bak-unabhängig Apoptose induzieren können von entscheidender Bedeutung. Auch Studien von van Delft et al. zeigten, dass Gossypol und HA14-1 Bax/Bak-unabhängigen Zelltod in murinen Fibroblasten auslösen [van Delft et al., 2006]. Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass Gossypol Bax/Bak-unabhängigen Zelltod in Mausfibroblasten auslöst, eine ionophore Wirkung auf die Mitochondrien hat und zusätzlich eine allosterische Veränderung von Bcl-2 bewirkt [Lei et al., 2006]. Die ionophore Wirkung sowie die allosterische Veränderung von Bcl-2 werden dort als für den Bax/Bak-unabhängigen Zelltod notwendig beschrieben.

Eine Hypothese zum Wirkmechanismus der untersuchten niedermolekularen Substanzen ist, dass sie aufgrund der vielen reaktiven Seitengruppen eine ionophore Wirkung auf Membranen haben und so die Mitochondrienmembran permeabilisieren, wodurch pro-apoptotische Faktoren wie Smac und Cytochrom c aus den Mitochondrien ausströmen und darüber die Caspasekaskade aktivieren. Möglicherweise vermitteln Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' aber auch die Permeabilisierung der Mitochondrien über die Öffnung der molekular nicht genau definierten PTP (mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore).

Die Behandlung von Zellen mit Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2' führt zur Aktivierung der Zelltodmaschinerie und wirkt sensitivierend auf resistente Tumorzellen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass diese Effekte unabhängig von der Bcl-2 Familie sind. Die Verwendung dieser Substanzen als Antikrebstherapeutika muss aber nicht ausgeschlossen werden, da sie, wie von uns und in verschiedenen experimentellen Studien gezeigt, Tumorzellen effektiv töten [Balakrishnan et al., 2008; Hamada et al., 2008; Heikaus et al., 2008; Hetschko et al., 2008; Macoska et al., 2008]. Auch die Fähigkeit von Gossypol und HA14-1 unabhängig von Bax und Bak Apoptose in Tumorzellen auszulösen, hat großes Potential für die Verwendung als Antikrebstherapeutika in Bax/Bak-defizienten Tumoren, da an dieser Stelle viele andere Therapeutika versagen. Einen Großteil unserer Untersuchungen haben wir in HCT116 Kolonkarzinomzellen durchgeführt, wobei wir zeigen konnten, dass Gossypol und HA14-1 effektiv Apoptose induzieren. Vor dem Hintergrund, dass in vielen Kolonkarzinomen das pro-apoptotische Protein Bax mutiert ist [Rampino et al., 1997; Sturm et al., 1999; Woerner et al., 2005], ergibt sich eine weitere Chance Gossypol und HA14-1 als potentielle Antikrebstherapeutika in Bax-defizienten Kolonkarzinomen einzusetzen. Der genaue Wirkmechanismus dieser Substanzen muss jedoch noch aufgeklärt werden.

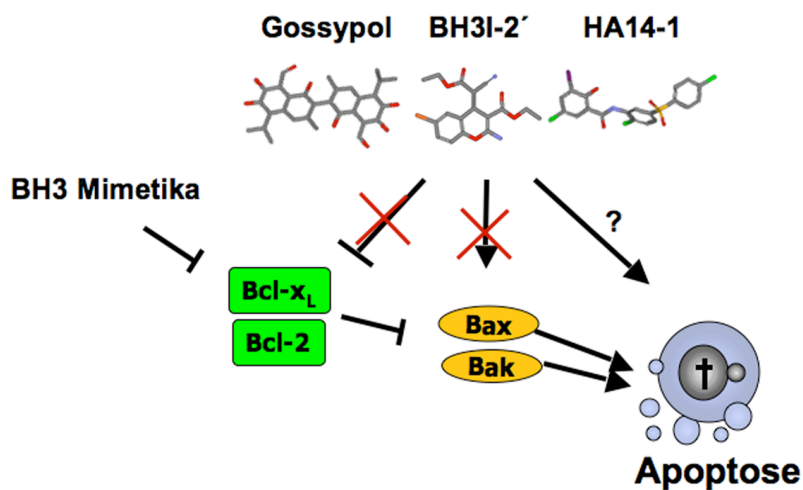


Abb. 37: Wirkmechanismen von Gossypol, HA14-1 und BH3I-2'

Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' wirken nicht über die Hemmung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x_L bzw. Bcl-2. Zudem wirken sie unabhängig von Bax und Bak. Die Behandlung mit diesen niedermolekularen Substanzen induziert Apoptose in verschiedenen Tumorzellen über einen noch unbekannten Mechanismus, aber im Gegensatz zu „echten“ BH3-Mimetika unabhängig von der Bcl-2 Familie.

6.2 Verschiedene Spleißvarianten des Noxa-Gens

Recherchen zum BH3-only Protein Noxa_S ergaben, dass es in einer Proteindatenbank (UniProtKB/Swiss Prot) zwei verschiedene Einträge gibt. Genauere Betrachtungen machten deutlich, dass es sich bei einem der Einträge um das bereits bekannte BH3-only Protein Noxa_S handelt. Das zweite vermerkte Protein, PMAIP1 Protein, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht charakterisiert. Sequenzanalysen ergaben, dass Noxa_S und PMAIP1 Protein, im Folgenden Noxa_S und Noxa_L genannt, zwei Spleißvarianten des humanen Gens *noxa* (Chromosom 18q21.32; Accession No. AC090377) sind. Genauere Betrachtungen der Exon-Intron-Grenzen des Noxa-Gens führten zudem zu der Vermutung, dass es noch eine dritte Spleißvariante von *noxa*, hier *noxa_{L2}* genannt, geben könnte (siehe Kapitel 5.2). Die verschiedenen Spleißvarianten wurden im Zuge dieser Arbeit untersucht.

Es sind verschiedene Stimuli bekannt, die zur Induktion des BH3-only Proteins Noxa_S führen [Mei et al., 2007; Morales et al., 2008; Oda et al., 2000; Rizzatti et al., 2008; Zaher et al., 2008]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Proteasominhibitoren Bortezomib und MG132 sowie das Tumorpromotormitogen PMA, bekannte Aktivatoren von Noxa_S, auch eine lange Spleißvariante des Noxa-Gens sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien induzierten. Um zu überprüfen, ob es sich bei der langen Spleißvariante von *noxa* um Noxa_L oder Noxa_{L2} handelte, wurden Sequenzanalysen der induzierten mRNAs durchgeführt. Diese Sequenzanalysen ergaben, dass es sich in allen untersuchten mRNAs um Noxa_L und nicht um Noxa_{L2} handelte. Somit konnten wir Noxa_{L2} nicht nachweisen, was zum einen damit zu begründen sein könnte, dass diese Spleißvariante unter den untersuchten Bedingungen nicht transkribiert wird oder das Noxa_{L2} in nur sehr geringen Mengen exprimiert wird und mit unseren Nachweisverfahren nicht detektiert wurde.

Der Nachweis von Noxa_L auf mRNA-Ebene machte deutlich, dass das humane Gen *noxa* alternativ gespleißt wird. In der Natur wird der Vorgang des alternativen Spleißens in zwei unterschiedlichen Zusammenhängen beobachtet. Zum einen wird die Vielfalt der Proteine eines Organismus gesteigert und zum anderen wird die posttranskriptionelle und oftmals zelltypspezifische Regulation derer möglich. Man unterscheidet konstitutives alternatives Spleißen (mehrere Versionen eines Proteins ein und desselben Gens werden in allen Zellen hergestellt) und reguliertes alternatives Spleißen (zelltypspezifische Expression unterschiedlicher Versionen eines Proteins oder der Wechsel von der Synthese eines funktionierenden Proteins zu einer nicht funktionierenden Form) [Alberts, 2003]. Die vorliegenden Ergebnisse zu Noxa_S und Noxa_L, weisen auf konstitutives alternatives Spleißen des Noxa-Gens hin.

Eine Veröffentlichung zeigte kürzlich nach unserem Wissen zum ersten Mal, dass nach p53-Induktion das genomische Expressionsprofil von humanen Lungenkrebszellen verschiedene Spleißvarianten von *noxa* aufweist [Wang und Sun, 2008]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *noxa_L* (dort *noxa* splicing variant 1 (NSV-1) genannt) durch Bortezomib und das DNA-schädigende Agens Etoposid auf mRNA-Ebene induziert wurde. Ihnen gelang jedoch kein Nachweis auf Proteinebene, was auf einen schnellen Proteasom-abhängigen und -unabhängigen Abbau von Noxa_L zurückgeführt wurde. Wir konnten hingegen zeigen, dass Noxa_L nicht nur auf mRNA-Ebene sondern auch auf Proteinebene induziert wurde. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche Zellsysteme verwendet wurden. Dies sind die ersten Hinweise darauf, dass alternatives Spleißen von *noxa* durch verschiedene Stimuli induziert werden kann.

6.3 Das BH3-only Protein Noxa_S induziert Apoptose in Zervixkarzinomzellen

Noxa_S wurde erstmals 1990 von Hijikata et al. erwähnt und dort als APR bezeichnet [Hijikata et al., 1990]. Oda et al. charakterisierten dann zum ersten Mal im Jahr 2000 das humane und das murine Protein Noxa_S und deren Fähigkeit nach Überexpression Apoptose zu induzieren [Oda et al., 2000]. Durch Koimmunopräzipitationen konnten sie zeigen, dass Noxa_S mit Bcl-x_L, Bcl-2 und Mcl-1 interagiert, nicht aber mit Bax. Die beobachteten Interaktionen beruhen auf einer intakten BH3-Domäne Noxa_S. Schlussfolgernd wurde zusammengefasst, dass Noxa_S selektiv an anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder bindet. Auch Chen et al. konnten durch kompetitive Bindungsstudien des Noxa_S BH3-Peptids und Koimmunopräzipitationen des vollständigen BH3-only Proteins nachweisen, dass Noxa_S ausschließlich an anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder bindet [Chen et al., 2005]. Allerdings konnten sie nur Bindungen zwischen Noxa_S und Mcl-1 bzw. Bfl-1 zeigen [Chen et al., 2005; Opferman et al., 2003]. Widersprüchlich zu den Ergebnissen von Oda et al. sind hingegen die Ergebnisse zur Fähigkeit der Apoptoseinduktion. So stufen Chen et al. Noxa_S als schwachen „Killer“ ein, da dessen Überexpression keine Apoptose induziert, was im murinen System gezeigt wurde [Chen et al., 2005]. Diese Veröffentlichungen machen deutlich, dass die funktionelle Rolle des BH3-only Proteins Noxa_S im komplexen System des Zelltods, im engeren Sinne der Apoptose, und die Interaktionen mit anderen Bcl-2 Familienmitgliedern noch nicht ausreichend verstanden sind. Aus diesem Grund wurde Noxa_S in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die vorherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Noxa_S und Noxa_L durch gleiche Stimuli in gleichen Zelltypen induziert wurden. Es ergibt sich daher die Frage, ob auch Noxa_L, welches keine BH3-Domäne enthält, apoptoseauslösende Funktionen besitzt. Diese Frage wurde im Zuge der Arbeit ebenfalls untersucht und wird im Folgenden diskutiert.

Um die Funktion von Noxa_S und Noxa_L in Zusammenhang mit Apoptose untersuchen zu können, wurden Adenoviren hergestellt, die eine regulierbare, auf einem Tet-off System beruhende Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L erlauben. Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien mit replikationsdefizienten Adenoviren infizierbar sind [Gillissen et al., 2003; Wendt et al., 2005]. Nach Infektion mit AdNoxa_S bzw. AdNoxa_L konnte unter off-Kondition keine Expression von Noxa_S bzw. Noxa_L detektiert werden sondern, wie erwartet, nur unter on-Kondition. Auch eine dosisabhängige Induktion konnte sowohl für Noxa_S als auch für Noxa_L gezeigt werden. Das verwendete adenovirale System war somit funktionell.

Die Überexpression des humanen BH3-only Proteins Noxa_S führte zum Zelltod in HeLa Zellen. Genauere Untersuchungen des Zelltods machten deutlich, dass die Überexpression von Noxa_S in Zervixkarzinomzellen in charakteristischen Merkmalen wie DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Aktivierung von Caspasen resultierte, was auf Apoptose schließen ließ. Auch andere Gruppen konnten durch Überexpression von Noxa_S Apoptose induzieren [Hassan et al., 2008; Oda et al., 2000]. Die Überexpression von BH3-only Proteinen, welche eine pro-apoptotische Gruppe der Bcl-2 Familie bilden, führt zur Induktion von Apoptose, da das Verhältnis von anti- und pro-apoptotischen Proteinen in Richtung der pro-apoptotischen Proteine verschoben wird und dies meist zum Zugrundegehen der Zelle führt. Kontrovers zu diesen Ergebnissen und diesem Erklärungsversuch ist das von Willis vorgeschlagene Modell, welches die BH3-only Proteine in schwache und potente Killer unterteilt [Willis und Adams, 2005]. Die von ihnen gezeigte selektive Bindung zwischen Noxa_S und Mcl-1 bzw. Bfl-1, führte zu der Hypothese, dass die Neutralisierung des anti-apoptotischen

Signals von Mcl-1 bzw. Bfl-1 nicht ausreicht, um Apoptose zu induzieren, da andere anti-apoptotische Familienmitglieder wie Bcl-x_L nicht von Noxa_S antagonisiert werden und als Überlebenssignal ausreichen. Chen et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die alleinige Überexpression von Noxa_S nicht ausreicht um Apoptose zu induzieren. Allerdings zeigten sie auch, dass eine gleichzeitige Überexpression von Noxa_S und Bad, welches u.a. Bcl-x_L bindet, zur Induktion von Apoptose führte, was damit zu erklären sein könnte, dass alle anti-apoptotischen Signale auf Ebene der Bcl-2 Familie antagonisiert sind und somit Bax und Bak aktiviert werden [Chen et al., 2005]. Somit stehen die Ergebnisse von Chen et al und Willis et al., welche keine Induktion von Apoptose durch Noxa_S allein und die Verringerung des Proteinniveaus von Mcl-1 zeigten, im starken Kontrast zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen, die nachwiesen, dass das BH3-only Protein Noxa_S Apoptose induzierte und dabei charakteristische Merkmale wie DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen hervorrief. Zudem wurde kein Expressionsniveau eines anti-apoptotischen Proteins, auch nicht das von Mcl-1, reguliert. Eine Möglichkeit die genannten Unterschiede zu erklären besteht darin, dass die einzelnen Versuchsanordnungen und verwendeten Zellsysteme variieren. So könnten zum einen unterschiedliche Expressionsniveaus von Noxa_S für die unterschiedlichen Resultate verantwortlich sein. Das von uns verwendete adenovirale Expressionssystem führt zu einer sehr starken Expression des Zielgens im Vergleich zur transienten Expression durch Transfektion. Des Weiteren könnten auch unterschiedliche Bcl-x_L Proteinniveaus in den verschiedenen Zellsystemen ausschlaggebend sein. In Zellen mit geringem Bcl-x_L Proteinniveau könnte die Antagonisierung des anti-apoptotischen Mcl-1 und Bfl-1 durch Noxa_S ausreichend sein, um Apoptose zu induzieren. Möglicherweise ist auch das Vorhandensein anderer Bcl-2 Familienmitglieder von entscheidender Bedeutung, welche in den unterschiedlichen Zellsystemen unterschiedlich exprimiert werden. Zudem wurden die meisten Untersuchungen von Chen et al. im murinen System durchgeführt, woraus sich im Vergleich zum humanen System möglicherweise wieder andere Wechselwirkungen zwischen den Bcl-2 Familienmitgliedern ergeben. In diesem Zusammenhang ist es von entscheidender Bedeutung zu erwähnen, dass das murine Noxa_S zwei BH3-Domänen und das humane Noxa_S nur eine BH3-Domäne besitzt. Auch dies hat möglicherweise Auswirkungen auf die Wechselwirkungen und Bindungen zwischen Noxa_S und anderen Bcl-2 Familienmitgliedern.

Der Mechanismus der Noxa_S-induzierten Apoptose und die Funktion bzw. Relevanz der anderen Bcl-2 Familienmitglieder in diesem Zusammenhang ist nach wie vor in weiten Teilen unklar. Weitere Untersuchungen zum Noxa_S-induzierten Zelltod wurden daher in dieser Arbeit durchgeführt und werden im Folgenden diskutiert.

Wie bereits erwähnt, ist es interessant zu untersuchen, ob auch Noxa_L, ohne BH3-Domäne apoptoseauslösende Funktionen besitzt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur Noxa_S sondern auch Noxa_L untersucht. Die Überexpression von Noxa_L in HeLa Zellen resultierte nicht in Apoptose, was auf das Fehlen einer BH3-Domäne zurückzuführen sein könnte. So wurde gezeigt, dass Noxa_S ohne funktionelle BH3-Domäne keine Apoptose induziert [Oda et al., 2000; Seo et al., 2003] und zudem auch nicht an Mcl-1 bindet [Willis et al., 2005]. Im Gegensatz dazu konnte Hossini et al. erstmals in 2006 zeigen, dass es eine Spleißvariante von *bcl-x* gibt, genauer *bcl-x_{AK}*, die keine BH3-Domäne besitzt und trotzdem in Melanomzellen Apoptose induziert [Hossini et al., 2006]. Es bedarf daher weiterer Untersuchungen zu Noxa_L, um zu überprüfen, ob Noxa_L möglicherweise in anderen Zellsystemen Apoptose induzieren kann oder nicht.

6.3.1 Regulation der Bcl-2 Familienmitglieder nach Expression von Noxa

Betrachtet man das Expressionsprofil der Bcl-2 Familienmitglieder vor und nach Überexpression von Noxa_S in Zervixkarzinomzellen (HeLa), so konnte keine Änderung der Expressionsniveaus der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1 und Bcl-x_L beobachtet werden. Die Überexpression von Noxa_S führte nicht zum Abbau von Mcl-1. Dies steht im Kontrast zu der Veröffentlichung von Willis et al., welche nach Überexpression von Noxa_S die Degradierung von Mcl-1 zeigt [Willis et al., 2005]. Allerdings wird bei genauerer Betrachtung der veröffentlichten Ergebnisse deutlich, dass dies nur in Bax/Bak-defizienten MEFs nachgewiesen werden konnte. Andere Veröffentlichungen konnten zeigen, dass die durch unterschiedliche Stimuli induzierte Apoptose entscheidend durch die Degradierung von Mcl-1 und die Induktion von Noxa_S vermittelt wird, wobei die Degradierung von Mcl-1 allein nicht ausreichte, sondern ein hohes Expressionsniveau von Noxa_S nötig war [Hallaert et al., 2007; Mei et al., 2007; Qin et al., 2006]. Möglicherweise ist die Degradierung von Mcl-1 also nicht für die Induktion von Apoptose notwendig. Auch die Veröffentlichung von Gillissen et al. weist darauf hin, da im Zuge der Nbk- bzw. Puma-vermittelten Apoptose Mcl-1 nicht abgebaut sondern stabilisiert wird. Puma bindet dabei direkt an Mcl-1 und setzt darüber Bak aus der Bindung mit Mcl-1 frei [Gillissen et al., 2007]. Die Bindung von BH3-only Proteinen an Mcl-1 könnte somit ausreichend sein und die Degradierung von Mcl-1 nicht notwendig, um die Apoptosekaskade zu induzieren. Auch Lee et al. konnten zeigen, dass ein mutiertes Bim BH3-Peptid, welches nur Mcl-1 bindet, aber nicht zu dessen Abbau führt, Apoptose induziert [Lee et al., 2008].

Das Expressionsniveau der pro-apoptotischen Proteine Bcl-x_S, Bak und der verschiedenen Bim-Spleißvarianten wurden nach Überexpression von Noxa_S nicht reguliert. Gleichzeitig konnte aber eine Reduktion von Bax detektiert werden. Diese ist durch Calpainaktivität zu erklären [Gao und Dou, 2000], welche zur proteolytischen Spaltung von Bax in ein p18 Fragment führt.

6.4 Noxa_S induziert Apoptose in Prostatakarzinomzellen

Die Überexpression des BH3-only Proteins Noxa_S löste Zelltod in Zervixkarzinomzellen aus. Dieser wies charakteristische Merkmale der Apoptose wie DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und Caspaseaktivierung auf.

Ergebnisse anderer Arbeiten weisen darauf hin, dass Noxa_S nur an anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder bindet, nicht aber an pro-apoptotische Multidomänenproteine Bax und Bak [Chen et al., 2005; Oda et al., 2000]. Noxa_S ist also kein direkter Bax/Bak Aktivator. Die Aktivierung von Bax und Bak ist für die Einleitung der Apoptosekaskade unabdingbar. Willis et al. konnten zeigen, dass Bak, welches an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, an Mcl-1 und Bcl-x_L bindet, nicht aber an Bcl-2, Bcl-w oder Bfl-1 [Willis et al., 2005]. Mutationen in der BH3-Domäne von Bak verhindern die Bindung an Mcl-1 bzw. Bcl-x_L und Oligomerisierung. Dadurch ist die pro-apoptotische Funktion von Bak blockiert. Bax liegt im Gegensatz zu Bak zytosolisch vor und bindet unter „normalen“ Bedingungen an kein anti-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie. Willis et al. konnten weiterhin zeigen, dass überexprimiertes Noxa_S in transformierten MEFs an Mcl-1 bindet und dadurch Bak aus der Bindung mit Mcl-1 verdrängt. Aufgrund dessen wird angenommen, dass die pro-apoptotische Wirkung von Noxa_S ausschließlich über Bak vermittelt wird. Auch für andere BH3-only Proteine konnte eine

selektive Bindungsaffinität gezeigt werden. So induziert z.B. Nbk Apoptose ausschließlich über einen Bax-abhängigen Mechanismus [Gillissen et al., 2003].

Aufgrund der vorhergesagten Bindungen von Noxa_S und der Fähigkeit von Noxa_S unter unseren Versuchsbedingungen Apoptose zu induzieren, war es interessant, die Rolle von Bax und Bak genauer zu analysieren. Dazu wurden DU145 mock Zellen verwendet, die eine Mutation im Leserahmen des Bax-Gens tragen und aus diesem Grund nur Bak aber nicht Bax exprimieren. Ob die Aktivierung von Bak durch Noxa_S zur Aktivierung von Bax führt und somit eine Amplifikation des apoptotischen Signals erreicht wird oder ob Bax redundant zu Bak wirkt, ist noch unklar. Um einen möglichen synergistischen Effekt von Bax und Bak im Zuge der Noxa_S-induzierten Apoptose nachweisen zu können, wurden DU145 Bax Zellen verwendet, die Bax reexprimieren und somit Bax/Bak-profizient sind.

Die Überexpression von Noxa_S führte zum Zelltod in DU145 Prostatakarzinomzellen. Genauere Analysen des Noxa_S-induzierten Zelltods in DU145 Zellen zeigten, dass es sich, wie in HeLa Zellen gezeigt, um Apoptose handelt. So induzierte die Überexpression von Noxa_S sowohl in DU145 mock als auch in DU145 Bax Zellen DNA-Fragmentierung und den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Ein Pancaspaseinhibitor hemmte die Noxa_S-induzierte Apoptose um ca. 50 %.

Die Noxa_S-induzierte Apoptose in DU145 mock Zellen, die nur Bak aber kein Bax exprimieren, weist eindeutig darauf hin, dass Bak allein ausreicht um den Noxa_S-induzierten Zelltod zu vermitteln. Dies wurde durch die Ergebnisse bestätigt, welche zeigten, dass Bak nach Überexpression von Noxa_S aktiviert wurde. Betrachtet man die beschriebenen Bindungspartner Mcl-1 und Bfl-1 von Noxa_S [Willis et al., 2005; Willis et al., 2007], so ist es nicht verwunderlich, dass Noxa_S unabhängig von Bax Apoptose induzieren kann, da Noxa_S Mcl-1 aus der Bindung mit Bak verdrängt und dadurch Bak frei und aktiviert wird. Davon ausgehend, dass BH3-only Proteine als potentielle Antikrebstherapeutika eingesetzt werden sollen, ist es von entscheidender Bedeutung die verschiedenen Wirkmechanismen der BH3-only Proteine aufzuklären. Die Aktivierung von Noxa_S in Tumoren, die kein funktionelles Bax besitzen, könnte zur Aktivierung oder Sensitivierung der Apoptosekaskade über Bak herangezogen werden. Die BH3-only Proteine Nbk und Puma wären für eine Therapie in solchen Tumoren gänzlich ungeeignet, da sie in humanen Karzinomzellen ausschließlich über Bax Apoptose induzieren können [Gillissen et al., 2003; Yu et al., 2003].

Weitere Untersuchungen im DU145 Zellsystem konnten zeigen, dass die Reexpression von Bax in DU145 Bax Zellen die Apoptoserate nach Überexpression von Noxa_S im Vergleich zu DU145 mock Zellen nicht erhöhte. Die zusätzliche Expression von Bax amplifizierte das zytotoxische Signal nicht. Sowohl in Bax- und Bak-exprimierenden als auch in nur Bak-exprimierenden Zellen konnte die Aktivierung von Bak nach Induktion von Noxa_S-Expression nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist, dass nach Expression von Noxa_S in Bax/Bak-profizienten Zellen, neben der Aktivierung von Bak, auch die Aktivierung von Bax zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von Bax zwar erfolgt, aber die Apoptoserate und somit den Ablauf der Apoptosekaskade nicht amplifizieren kann. Allerdings konnte mit Hilfe dieses Zellsystems nicht geklärt werden, ob die Aktivierung von Bax abhängig oder unabhängig von der Bak-Aktivierung erfolgt. Die Aktivierung von Bak führt zur Permeabilisierung der Mitochondrien und diese wiederum zur Aktivierung der Caspasen. Caspase-3 spaltet Bid zu tBid, welches wiederum Bax aktivieren kann. So kann es zu einer nachgeschalteten Aktivierung von Bax kommen. Ob es sich um eine nachgeschaltete Aktivierung von Bax handelt, wurde ebenfalls untersucht und wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Es konnte aber gezeigt werden, dass die Noxa_s-induzierte Apoptose allein über die Aktivierung von Bak erfolgen kann.

6.5 Noxa_s induziert Zelltod unabhängig von Bax und Bak

Die bisherigen Ergebnisse machen deutlich, dass die Überexpression des BH3-only Proteins Noxa_s Zelltod in verschiedenen Zellsystemen auslöst und dabei charakteristische Merkmale der Apoptose aufwies. Wir konnten zeigen, dass die Noxa_s-induzierte Apoptose allein durch Bak vermittelt werden kann. Zudem führt die Überexpression von Noxa_s neben der Aktivierung von Bak auch zur Aktivierung von Bax, wobei bisher nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Bax-Aktivierung abhängig von Bak erfolgt. Außerdem ist weiterhin unklar, ob die Noxa_s-induzierte Apoptose auch über Bax allein vermittelt werden kann, also ob Bax und Bak redundant wirken. Um die Funktion von Bax und Bak und deren Wechselwirkung im Zusammenhang mit Noxa_s-induzierter Apoptose genauer untersuchen zu können, wurden HCT116 wt Kolonkarzinomzellen, die sowohl Bax als auch Bak exprimieren, Bax-defiziente, Bak-defiziente sowie Bax/Bak-defiziente HCT116 Zellen verwendet.

Wir konnten zeigen, dass die adenovirale Überexpression von Noxa_s in HCT116 Kolonkarzinomzellen zum Zelltod führte. Es wurden nach Überexpression von Noxa_s keine Unterschiede in der Zelltodrate zwischen Bax-defizienten und Bax/Bak-profizienten HCT116 Kolonkarzinomzellen detektiert. Auch in DU145 Zellen führte eine Reexpression von Bax neben endogenen Bak nicht zur Amplifikation der Apoptoserate und bestätigt somit diese Ergebnisse. Die gleichzeitige Expression von Bax und Bak verstärkt im Vergleich zur alleinigen Expression von Bak das Noxa_s-induzierte Zelltodsignal nicht.

Die Fähigkeit von Noxa_s, in Bak-defizienten, Bax-profizienten Zellen Apoptose zu induzieren, war aufgrund der bisherigen Veröffentlichungen [Oda et al., 2000; Willis et al., 2005] ein überraschendes Ergebnis, und weist darauf hin, dass Bax und Bak redundant wirken. Es war nicht zu erwarten, dass die Überexpression von Noxa_s in Bax+/Bak- Zellen zum Zelltod führt, da nach dem oben beschriebenen Modell ohne Bak keine Aktivierung der Apoptosekaskade erfolgen kann. Eine andere Publikation konnte allerdings zeigen, dass auch Bax an Mcl-1 bindet [Zhai et al., 2008]. Ausgehend davon, könnte Noxa_s Bax aus der Bindung mit Mcl-1 verdrängen und damit zu dessen Aktivierung und Initiation der Apoptosekaskade führen. Möglicherweise ist in Abwesenheit von Bak die Aktivierung von Bax aber auch über einen bislang noch unbekannten Mechanismus möglich. So wurde bereits im Jahr 2001 von Cheng et al. gezeigt, dass die retrovirale Expression von Noxa_s in Bax/Bak-profizienten MEFs, Bax-defizienten MEFs und Bak-defizienten MEFs Apoptose induziert, nicht aber in Bax/Bak-defizienten Zellen [Cheng et al., 2001]. Diese Ergebnisse und auch die, die im Folgenden diskutiert werden, legen die Vermutung nahe, dass es noch andere Mechanismen, unabhängig von der Mcl-1 Antagonisierung, zur Aktivierung der Apoptose nach Überexpression von Noxa_s geben muss. Oda et al. wiesen eine Bindung zwischen Noxa_s und Bcl-x_L bzw. Bcl-2 nach [Oda et al., 2000]. Somit könnte die Überexpression von Noxa_s Bcl-2 und Bcl-x_L neutralisieren und dadurch zur Aktivierung von Bax führen.

Besonders kontrovers zu publizierten Daten zum Mechanismus der Noxa_s-vermittelten Apoptose ist, dass die Überexpression von Noxa_s auch in Bax/Bak-defizienten Kolonkarzinomzellen DNA-Fragmentierung induzierte. Es konnte nach Überexpression von Noxa_s kein wesentlicher Unterschied in der Zelltodrate zwischen Bax/Bak-defizienten und Bax/Bak-profizienten Zellen festgestellt werden. Es ist aber allgemein anerkannt, dass Apoptose

nicht ohne Bax und Bak induziert werden kann [Lindsten et al., 2000; Rathmell et al., 2002]. Daher ergibt sich die Frage, ob es sich bei der nach Überexpression von Noxa_s beobachteten DNA-Fragmentierung, auch wirklich um Apoptose handelt, oder um einen anderen Zelltodmechanismus wie Autophagie, Nekrose oder mitotische Katastrophe, der unabhängig von Bax und Bak erfolgen kann [Kim et al., 2006]. Apoptose wird unter anderem durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung von Caspasen charakterisiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der durch Noxa_s induzierte Zelltod in Bax/Bak-profizienten und Bax/Bak-defizienten Kolonkarzinomzellen sowohl mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials als auch mit der Aktivierung von Caspasen einhergeht. Die Relevanz der Caspasen im Zuge der Noxa_s-induzierten Apoptose konnte funktionell durch die Hemmung der Apoptose mittels eines Caspaseinhibitors nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse weisen also auf Apoptose als Zelltodform in Bax/Bak-defizienten Zellen nach Überexpression von Noxa_s hin. Dies steht im starken Kontrast zu den genannten Veröffentlichungen.

Ein weiterer Ansatz, die Noxa_s-induzierte Apoptose in Bax/Bak-defizienten Zellen zu erklären besteht darin, dass Noxa_s an den Mitochondrien lokalisiert ist [Hassan et al., 2008; Oda et al., 2000; Seo et al., 2003]. In Bax/Bak-defizienten Zellen könnten hohe Noxa_s-Expressionsniveaus an den Mitochondrien ausreichend sein, um die Aktivierung der Mitochondrien unabhängig von Bax und Bak durch die Öffnung der PTP zu vermitteln. Es wird angenommen, dass die PTP aus dem VDAC (Voltage-dependent Anion Channel), dem ANT (Adenin-Nukleotid-Translokator), Cyclophilin D (eine mitochondriale Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase) und anderen Proteinen besteht. Die PTP wird neben der Porenbildung durch Bax und Bak als eine Möglichkeit diskutiert, die das Freisetzen von pro-apoptotischen Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum reguliert [Tsujimoto und Shimizu, 2007]. Führt die Expression von Noxa_s direkt zur Öffnung der PTP, so würde unter anderem Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, welches zusammen mit dATP, APAF-1 und Procaspase-9 das Apoptosom bildet und über das Prinzip der induzierten Nähe die proteolytische Spaltung und damit die Aktivierung von Caspase-9 vermittelt. Hinweise auf diesen Mechanismus liefern auch die Ergebnisse von Seo et al., die gezeigt haben, dass die Verwendung von Inhibitoren der Permeabilitätstransitionspore, wie Cyclosporin A, die Noxa_s-induzierte Cytochrom-c-Freisetzung hemmt [Seo et al., 2003]. Zusätzlich ruft Noxa_s ultrastrukturelle Veränderungen der Mitochondrien (Anschwellen der Mitochondrien) hervor, was die Öffnung der PTP zur Folge haben könnte. Studien von Sugiyama et al. konnten zeigen, dass Bim direkt mit VDAC interagiert und darüber Cytochrom-c-Freisetzung aus den Mitochondrien vermittelt, welche unabhängig von Bax und Bak erfolgen kann [Sugiyama et al., 2002]. Möglicherweise vermittelt auch Noxa_s durch die Bindung an VDAC, unabhängig von Bax und Bak, die Freisetzung von Cytochrom c. Allerdings haben andere Veröffentlichungen gezeigt, dass Bak mit VDAC2, welches in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, interagiert [Chandra et al., 2005; Cheng et al., 2003]. VDAC2 blockiert durch die Bindung an Bak dessen Aktivierung und wirkt somit Apoptose-hemmend. BH3-only Proteine wie Bim, Bad oder tBid verdrängen VDAC2 aus der Bindung an Bak, wodurch Bak aktiviert wird. So ist noch unklar ob VDAC2 die Freisetzung von Cytochrom c wirklich unabhängig von Bak und Bax vermitteln kann.

Unabhängig von der PTP könnte auch ein anderer, noch völlig unbekannter, mitochondrialer Mechanismus zur Aktivierung der Apoptosekaskade führen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Änderung der Mitochondrienstruktur im Zuge der Apoptose entscheidend für die Freisetzung des gesamten Cytochrom c ist [Scorrano et al., 2002]. OPA1 (Optic atrophy 1) ist in der inneren Mitochondrienmembran und im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert und neben anderen Proteinen wie Mfn1 (Mitofusin1) und Mfn2 entscheidend an der Fusion der Mitochondrien beteiligt [Cipolat et al., 2004; Meeusen et al., 2006]. Weitere

Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass OPA1 in Form von Oligomeren an den mitochondrialen Cristae lokalisiert [Frezza et al., 2006]. Die korrekte Anordnung dieser Oligomere wird durch PARL (presenilin-associated rhomboid-like protease) kontrolliert, indem PARL OPA1 aus dem Intermembranraum an die innere Mitochondrienmembran rekrutiert [Delivani und Martin, 2006]. Im Zuge der Apoptose werden die Oligomere von OPA1 destabilisiert, was in der Öffnung der mitochondrialen Cristae resultiert. Erst die Öffnung der Cristae ermöglicht die Freisetzung des gesamten Cytochrom c in den Intermembranraum, dies ist wiederum die Voraussetzung für das Freisetzen des gesamten Cytochrom c in das Zytosol [Pellegrini und Scorrano, 2007]. Die Öffnung der Cristae ist dabei unabhängig von Bax und Bak. Es konnte gezeigt werden, dass BH3-only Proteine wie tBid oder Nbk OPA1-Oligomere zerstören [Germain et al., 2005; Scorrano et al., 2002]. Möglicherweise führt auch Noxa_s zur Zerstörung der OPA1-Oligomere.

Bok ist neben Bax und Bak das dritte Mitglied der Bax-Subfamilie. So könnte Bok in Bax/Bak-defizienten Zellen die Funktion von Bax und/oder Bak übernehmen und die Noxa_s-induzierte Apoptose vermitteln. Allerdings ergaben genetische Analysen zu Bok bisher sehr wenig über dessen pro-apoptotische Funktion. *Bok*^{-/-} Mäuse zeigten nach genotoxischem Stress keine Apoptosedefekte und waren vital. Der Nachweis von Bok auf Proteinebene in HCT116 Zellen gelang uns jedoch nicht. Dies könnte auf die verwendeten Antikörper zurückzuführen sein, da auch in anderen untersuchten Zellen Bok nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl es verschiedene Veröffentlichungen gibt, die Bok in humanen Ovar-, Leber- und Nierengewebe sowie in Melanomen nachgewiesen haben [Fecker et al., 2006; Hsu et al., 1997; Lee et al., 2001]. Um den potentiellen Einfluss von Bok in der Noxa_s-induzierten Apoptose zu untersuchen könnten Bok siRNA eingesetzt werden.

Eine weitere Publikation konnte zeigen, dass Noxa_s nicht nur an den Mitochondrien, sondern auch am ER lokalisiert ist [Hassan et al., 2008]. Eventuell vermittelt Noxa_s am ER die Aktivierung von ER-Stresssignalen und induziert darüber Apoptose. ER-Stresssignale führen zur Aktivierung der Proteinkinasen IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) und PERK (pancreatic endoplasmic reticulum eIF2 α kinase) sowie des Transkriptionsfaktors ATF6 (activating transcription factor 6) [Szegezdi et al., 2006]. PERK phosphoryliert und inaktiviert den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α , wodurch die Proteintranslation gehemmt wird [Raven und Koromilas, 2008]. Gene die im 5'-untranslatierten Bereich regulatorische Sequenzen wie eine IRES (internal ribosomal entry site) besitzen, können den Translationsblock umgehen. ATF4 ist eines dieser Gene und vermittelt die Expression von Genen die den Aminosäuremetabolismus aufrechterhalten, aber auch von pro-apoptotischen Faktoren wie CHOP (C/EBP Homologes Protein) [Harding et al., 2003]. Auch der Transkriptionsfaktor ATF6 vermittelt die Genexpression von CHOP [Shen und Prywes, 2004]. PERK und CHOP aktivieren dann weitere Apoptosesignale, wodurch es zur Aktivierung von Caspasen am ER kommt. Die Mechanismen der Caspaseaktivierung sind bisher kaum untersucht, wobei Procaspase-4 und Procaspase-8 als Initiatorcaspasen, die die Apoptosekaskade auslösen, diskutiert werden [Szegezdi et al., 2006]. Noxa_s könnte also unabhängig von den Mitochondrien, sowie Bax und Bak die Caspasekaskade aktivieren. Des Weiteren wird im Zuge des ER-Stress' Calcium aus dem ER freigesetzt [Pinton et al., 2008], welches direkt mitochondriale Permeabilisierungskanäle stimulieren kann, die möglicherweise unabhängig von Bax und Bak sind. So konnten Hassan et al. zeigen, dass Noxa_s-induzierte Apoptose mit intrazellulärer Calciumfreisetzung einhergeht [Hassan et al., 2008]. Dieser könnte zur Bax/Bak-unabhängigen Öffnung von Permeabilitätskanälen führen.

Problematisch bei der Betrachtung der Ergebnisse ist, dass es sich bei den verwendeten Bak-defizienten und Bax/Bak-defizienten HCT116 Zellen um Bak knock down Zellen handelt und somit nicht ausgeschlossen

werden kann, dass eine geringe „Restexpression“ von Bak vorhanden ist (unterhalb der Westernblotnachweisgrenze), welche die Induktion der Apoptose nach Überexpression von Noxa_S vermittelt. Um diese Eventualität auszuschließen, müssten humane Bax/Bak doppel knock out Zellen generiert werden und die Untersuchungen zur Noxa_S-induzierten Apoptose wiederholt werden.

Die Überexpression von Noxa_L in HCT116 Kolonkarzinomzellen zeigte, wie bereits in HeLa Zellen beobachtet, keinen apoptotischen Effekt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das BH3-only Protein Noxa_S Apoptose in verschiedenen Zellsystemen induziert und diese über Bak aber auch Bax vermittelt werden kann. Die Aktivierung von Noxa_S in Bax-defizienten Tumoren scheint durch die Fähigkeit Noxa_S Bak und damit die Apoptosekaskade zu aktivieren in jedem Fall vielversprechend, da Suzuki et al. zeigen konnten, dass Noxa_S nur in Karzinomen nicht aber in normalen Zellen Apoptose induziert [Suzuki et al., 2009]. Zudem weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass Noxa_S auch unabhängig von Bak und Bax Apoptose induziert. Dies wurde bisher für kein BH3-only Protein gezeigt und weist auf einen neuen, noch unbekannten Mechanismus der Apoptoseinduktion durch BH3-only Proteine hin.

6.5.1 Regulation der Bcl-2 Familienmitglieder

Wie bereits in HeLa Zellen beobachtet, wurde auch in HCT116 Zellen keine Änderung der Expressionsniveaus der anti-apoptotischen Proteine Mcl-1, Bcl-2 oder Bcl-x_L nach Überexpression von Noxa_S detektiert. In Bezug auf die pro-apoptotischen Proteine konnte ebenfalls keine Regulation (abgesehen von Bax) detektiert werden. Die beobachteten Ergebnisse wurden bereits im Zusammenhang der Überexpression von Noxa_S in HeLa Zellen diskutiert. Aus diesem Grund wird auf Kapitel 6.3.1 verwiesen.

6.6 Noxa_L induziert Apoptose in Prostatakarzinomzellen

Noxa_L ist eine bisher noch nicht charakterisierte Spleißvariante des Noxa-Gens, welche aus drei Exons besteht und für ein 14 kDa großes Protein kodiert. Im Unterschied zu Noxa_S besitzt Noxa_L keine BH3-Domäne. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Noxa_L in gleichen Zelltypen wie Noxa_S durch Stimuli wie MG132, Bortezomib oder PMA induziert wurde. Aufgrund dessen ergab sich die Frage, ob Noxa_L ebenfalls apoptoseauslösende Funktionen besitzt. In den bislang untersuchten Zellsystemen HCT116 und HeLa konnte keine Apoptose nach Überexpression von Noxa_L nachgewiesen werden. Anders verhält es sich in DU145 Prostatakarzinomzellen. So führte die Überexpression von Noxa_L in diesen Zellen zum Zelltod. Genauere Analysen konnten zeigen, dass Noxa_L DNA-Fragmentierung, Bax- und Bak-Aktivierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung von Caspasen induzierte. Durch diese Charakteristika konnte nachgewiesen werden, dass Noxa_L Apoptose induziert. Zudem konnte die Noxa_L-induzierte Apoptose durch Caspaseinhibitoren komplett gehemmt werden. Eine Ursache, für die Fähigkeit von Noxa_L Apoptose in DU145 Zellen aber nicht in HeLa oder HCT116 Zellen zu induzieren, könnte sein, dass Noxa_L an noch unbekannte Interaktionspartner bindet, deren Expression unterschiedlich zwischen den genannten Zelllinien ist. Möglicherweise ist die apoptotische Wirkung von Noxa_L auf Prostatazellen beschränkt, um dies zu überprüfen sind weitere Untersuchungen sowohl in Prostatakarzinomzellen als auch in anderen Zellsystemen nötig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zu Noxa_L stehen im Kontrast zu den Daten von Wang et al., welche keine apoptoseauslösenden Funktionen von Noxa_L in ihren Zellsystemen feststellen konnten [Wang und Sun, 2008]. Ursachen für diese Unterschiede können im gewählten Expressionssystem liegen, so ist die Expression von Zielgenen durch Adenoviren sehr stark und die transiente Expression durch Transfektion oftmals weniger intensiv. Zusätzlich verwendeten Wang et al. für ihre Untersuchungen andere Zellsysteme, was den Unterschied ebenfalls erklären könnte.

Wir konnten des Weiteren zeigen, dass die Überexpression von Noxa_L zur Aktivierung von Bak führt (Abb. 38). Diese ist ausreichend um die Apoptosekaskade zu aktivieren, da DU145 mock Zellen, welche kein Bax exprimieren, nach Induktion von Noxa_L in Apoptose resultierten. Betrachtet man die Apoptoserate der Bak-exprimierenden und Bax-reexprimierenden Zellen nach Überexpression von Noxa_L, so ist kein Unterschied im Vergleich zu DU145 mock Zellen zu beobachten. Somit kann wie für Noxa_S auch für Noxa_L zusammengefasst werden, dass die Reexpression von Bax die Apoptoserate nicht erhöht, obwohl in Bax/Bak-profizienten DU145 Zellen die Aktivierung von Bak und Bax nachweisbar war. Ob Bax und Bak redundant wirken, konnte in diesem Zellsystem nicht untersucht werden und bedarf weiterer Analysen in anderen Zellsystemen.

Um den Wirkmechanismus der Noxa_L-induzierten Apoptose genauer erklären zu können ist es unabdingbar, Bindungspartner von Noxa_L zu identifizieren, wobei eine Interaktion zwischen Noxa_L und der Bcl-2 Familie unwahrscheinlich scheint, da Noxa_L keine BH3-Domäne besitzt. Möglichkeiten, Bindungspartner von Noxa_L zu finden, bestehen zum einen im Einsatz von Koimmunopräzipitationen und der anschließenden massenspektroskopischen Analyse der Bindungspartner und zum anderen in der Verwendung von Protein-Mikroarrays.

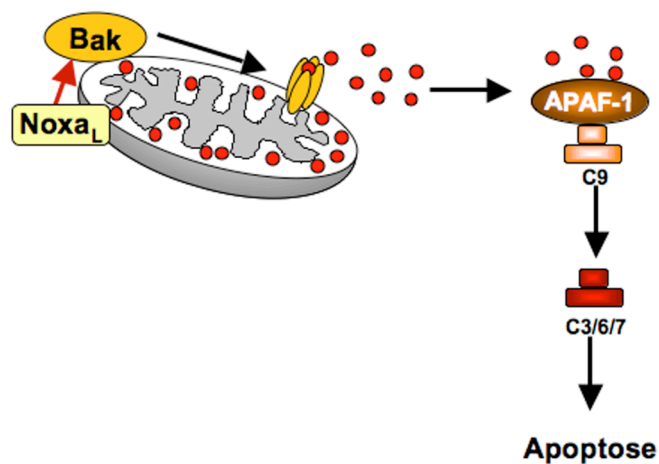


Abb. 38: Modell zur Noxa_L-induzierten Apoptose

Noxa_L führt zur Aktivierung von Bak (durch roten Pfeil dargestellt). Dies führt zur Oligomerisierung von Bak in der äußeren Mitochondrienmembran. Bak-Oligomere vermitteln die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c und Smac aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Zytosolisches Cytochrom c bindet an APAF-1. APAF-1 bindet als Energielieferanten dATP und kann in Folge einer Konformationsänderung Procaspase-9 (C9) binden, wodurch über das Prinzip der induzierten Nähe Caspase-9 aktiviert wird. Caspase-9 spaltet proteolytisch die Effektorcaspasen (C3, C7, C6) und führt über die Proteolyse von strukturellen und regulatorischen Substratproteinen zum Zugrundegehen der Zelle.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Überexpression von Noxa_L, ein Protein ohne BH3-Domäne, in Prostatakarzinomzellen in Apoptose resultiert, wobei der Mechanismus der Bak-Aktivierung derzeit noch unklar ist.

Es wurde bereits eine Spleißvariante von Bcl-x beschrieben, Bcl-x_{AK}, die ohne BH3-Domäne Apoptose auslöst [Hossini et al., 2006]. Somit ist Noxa_L ein weiteres Protein, welches von einem Gen der Bcl-2 Familie translatiert wird und keine BH3-Domäne besitzt, aber trotzdem Apoptose induzieren kann. Dies lässt auf weitere noch unbekannte Mechanismen der Apoptoseinduktion bzw. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Apoptosesignalwegen und Bcl-2 Familienmitgliedern schließen.

6.7 subzelluläre Lokalisation von Noxa_L

Es konnte bereits von anderen Gruppen gezeigt werden, dass das BH3-only Protein Noxa_S an den Mitochondrien lokalisiert ist [Oda et al., 2000; Seo et al., 2003]. Oda et al. weisen zudem darauf hin, dass die BH3-Domäne (AS 29-37) für die mitochondriale Lokalisation relevant ist, wohingegen Seo et al. eine mitochondriale Zielsequenz in der C-terminalen Region (AS 41-50) identifiziert haben. Aufgrund der Verschiebung des Leserahmens im Zuge des Spleißens, unterscheiden sich Noxa_S und Noxa_L im C-terminalen Bereich, was vermuten lässt, dass Noxa_L nicht an den Mitochondrien lokalisiert ist. Zur Untersuchung der Lokalisation von Noxa_L wurde ein konfokales Mikroskop verwendet. Wir konnten erstmals zeigen, dass exogenes Noxa_L, entgegen der Erwartung, sowohl an den Mitochondrien als auch im Nukleus lokalisiert war. Aufgrund der bisherigen Veröffentlichungen und der Sequenzunterschiede zwischen Noxa_S und Noxa_L ist es unwahrscheinlich, dass es sich um die gleiche mitochondriale Zielsequenz handelt. Die Suche nach einer Transmembrandomäne oder eines hydrophoben Bereichs innerhalb von Noxa_L blieb allerdings erfolglos.

Oda et al. und Seo et al. heben hervor, dass die mitochondriale Lokalisation von Noxa_S entscheidend für die Fähigkeit der Apoptoseinduktion ist [Oda et al., 2000; Seo et al., 2003], womit sich die Frage ergibt, ob die mitochondriale Lokalisation von Noxa_L ebenfalls entscheidend für die Apoptoseinduktion ist. Möglicherweise bindet Noxa_L an mitochondrienassoziierte Proteine wie Bak, Bcl-2 oder VDAC2 und vermittelt darüber Zelltod. VDAC2 interagiert mit Bak und blockiert durch diese Bindung die Aktivierung von Bak. BH3-only Proteine wie Bim, Bad oder tBid verdrängen VDAC2 aus der Bindung an Bak, wodurch Bak aktiviert wird [Chandra et al., 2005; Cheng et al., 2003]. Vielleicht wirkt auch Noxa_L durch die Verdrängung von Proteinen wie VDAC2, Bfl-1 oder Mcl-1 aus der Bindung mit Bak und der daraus resultierenden Bak-Aktivierung apoptoseinduzierend.

Es ist bekannt, dass sich im Zuge der Apoptose die Morphologie der Mitochondrien von tubulären hin zu fragmentierten, punktförmig anmutenden Strukturen verändert [Youle und Karbowski, 2005]. Die Spaltung der Mitochondrien wird von DRP1 (dynamin-related protein 1), FIS1 und Endophilin B1 vermittelt. Hemmt man DRP1 mit einem Dominant-Negativen DRP1 so wird nicht nur die Fragmentierung der Mitochondrien unterbunden, sondern auch die Caspaseaktivierung verzögert bzw. gehemmt [Frank et al., 2001]. Karbowski et al. konnten außerdem zeigen, dass Bax und Bak im Zuge der Apoptose an den Spaltstellen der Mitochondrien lokalisieren, was zu der Vermutung führte, dass Bax und Bak am Spaltungsprozess der Mitochondrien beteiligt sind [Karbowski et al., 2002; Karbowski et al., 2006]. Möglicherweise spielt auch Noxa_L eine Rolle im Spaltungsprozess der Mitochondrien. Um dieser Hypothese nachzugehen sind weitere Analysen erforderlich.

Welche Funktion die nukleäre Lokalisation von Noxa_L einnimmt und warum diese in nur ca. 30-40 % der Zellen beobachtet wurde, ist noch völlig unklar. Vergleiche der Noxa_L Sequenz mit bekannten Zellkernlokalisationssequenzen ergaben keine Übereinstimmungen. Ohnehin sind genauere Untersuchungen mit endogenem Noxa_L

zur Klärung der Lokalisation unabdingbar. Zielgerichtete Mutationen innerhalb von Noxa_L könnten helfen die mitochondriale und nukleäre Zielsequenz ausfindig zu machen.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs durch Bcl-2 Inhibitoren und BH3-only Proteine zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit wurden die putativen Bcl-2 Inhibitoren Gossypol, HA14-1 sowie BH3I-2' und deren Wirkmechanismen untersucht. Es wurde beschrieben, dass Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' BH3-Peptide aus der Bindung mit Bcl-2 bzw. Bcl-x_L verdrängen und Apoptose induzieren [Degterev et al., 2001; Kitada et al., 2003; Wang et al., 2000]. Wir konnten zeigen, dass die Überexpression von Bcl-x_L bzw. Bcl-2 in Tumorzellen die BH3-Mimetika-induzierte Apoptose nicht hemmte. Zuvor haben wir nachgewiesen, dass die Überexpression von Bcl-2 bzw. Bcl-x_L die Zytostatika-induzierte Apoptose blockierte. Somit konnte der protektive Effekt von Bcl-2 und Bcl-x_L durch die putativen Bcl-2 Inhibitoren Gossypol und HA14-1 komplett und durch BH3I-2' zum Teil überwunden werden. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Gossypol, HA14-1 und zum Teil auch BH3I-2' unabhängig von Bax und Bak DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung von Caspasen induzierten. Durch diese charakteristischen Merkmale ist gezeigt, dass Gossypol, HA14-1 und zum Teil auch BH3I-2' unabhängig von Bax und Bak Apoptose induzieren. Zusammenfassend wurde deutlich, dass die Gossypol- und die HA14-1-induzierte Apoptose unabhängig von der Bcl-2 Familie sind. Auch die BH3I-2'-induzierte Apoptose ist davon zum Teil unabhängig. Da Gossypol, HA14-1 bzw. BH3I-2' „off-target“-Effekte aufweisen, kann der Wirkmechanismus nicht der eines Bcl-2 Inhibitors sein. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse könnten Gossypol, HA14-1 und BH3I-2' aber als potentielle Therapeutika für Bax-, Bak- oder auch Bax/Bak-defizienten Tumoren herangezogen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Regulation des intrinsischen Apoptosesignalwegs durch pro-apoptotische Bcl-2 Proteine, am Beispiel des BH3-only Proteins Noxa_S, untersucht. Das humane Gen *noxa* ist auf Chromosom 18q21 lokalisiert. Die Expression putativer Spleißvarianten des Noxa-Gens wurde durch Stimuli wie Bortezomib, MG132 und PMA auf mRNA- und Proteinebene induziert. Hierbei wurde das bekannte Noxa_S als kurze Spleißvariante und eine bisher unbekannte, lange Spleißvariante (Noxa_L) gefunden. Zur funktionellen Analyse und effizienten ektopen Expression wurden konditionale adenovirale Expressionsvektoren für beide Noxa-Varianten hergestellt. Die Expression des BH3-only Proteins Noxa_S induzierte in verschiedenen Karzinomzellen die Aktivierung von Bax und Bak, den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, DNA-Fragmentierung sowie Caspaseaktivierung und somit Apoptose. Zudem konnten wir nachweisen, dass die Noxa_S-induzierte Apoptose allein durch Bak oder Bax vermittelt werden kann. Eine gleichzeitige Expression von Bax und Bak erhöhte die Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen Expression von Bax oder Bak nicht. Bak war jedoch der wesentliche Effektor der Noxa_S-induzierten Apoptose. Völlig neu sind die Ergebnisse, dass der Noxa_S-induzierte Zelltod auch unabhängig von Bax und Bak erfolgen kann. Durch genauere Analysen konnten wir zeigen, dass Noxa_S unabhängig von Bax und Bak DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und Caspaseaktivierung induzierte. Zudem konnte die DNA-Fragmentierung durch einen Pancaspaseinhibitor gehemmt werden. Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf die Zelltodform Apoptose hin. Aufgrund der Bax/Bak-unabhängigen Apoptose liegt es nahe, dass Noxa_S neben der Aktivierung von Bax und Bak auch noch einen völlig anderen Weg der Apoptoseinduktion geht, möglicherweise über die direkte Aktivierung des ERs oder der Bax/Bak-unabhängigen Öffnung der PTP oder einen anderen noch unbekannten Mechanismus der Mitochondrienaktivierung. Die Aktivierung von Noxa_S in Bax-defizienten Tumoren scheint durch die Fähigkeit Noxa_S Bak und damit die Apoptosekaskade zu aktivieren in jedem Fall vielversprechend.

Die lange Spleißvariante von *nox*a, *nox*a_L besitzt im Gegensatz zu *nox*a_S aufgrund des Spleißmechanismus neben Exon 1 sowie Exon 3 auch Exon 2 und im Vergleich zu *nox*a_S einen verschobenen Leserahmen im Exon 3. Dies hat zur Folge, dass das Protein Noxa_L keine BH3-Domäne enthält. Die Überexpression von Noxa_L induzierte Zelltod in DU145 Prostatakarzinomzellen. Nach Noxa_L-Expression konnten DNA-Fragmentierung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Bax- und Bak-Aktivierung und die Hemmbarkeit der DNA-Fragmentierung durch einen Pancaspaseinhibitor nachgewiesen werden. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass Noxa_L Apoptose induziert. Außerdem kann die Noxa_L-induzierte Apoptose allein über Bak vermittelt werden. Eine zusätzliche Expression von Bax amplifiziert die Apoptoserate nicht. Wir konnten somit erstmals zeigen, dass eine Spleißvariante des Noxa-Gens, *nox*a_L, welche keine BH3-Domäne besitzt, Apoptose in Prostatakarzinomzellen induziert. Zusätzliche Lokalisationsstudien zu Noxa_L ergaben, dass Noxa_L sowohl an den Mitochondrien als auch im Nukleus lokalisiert zu sein scheint. Die vorliegende Arbeit liefert somit neue Erkenntnisse zur Zelltodregulation und experimentellen Apoptoseinduktion über BH3-unabhängige Signalmechanismen.

Literaturverzeichnis

Adams, J. M. und Cory, S. (2007): The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene* (Band 26), Nr. 9, Seite 1324-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17322918

Adesanya, M. R.; Redman, R. S.; Baum, B. J. und O'Connell, B. C. (1996): Immediate inflammatory responses to adenovirus-mediated gene transfer in rat salivary glands, *Hum Gene Ther* (Band 7), Nr. 9, Seite 1085-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8773510

Alberts, B (2003): *Molekularbiologie der Zelle* (Band 4), Wiley-VCH.

Balakrishnan, K.; Wierda, W. G.; Keating, M. J. und Gandhi, V. (2008): Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells, *Blood* (Band 112), Nr. 5, Seite 1971-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18566329

Banerjee, D. (2001): Genasense (Genta Inc), *Curr Opin Investig Drugs* (Band 2), Nr. 4, Seite 574-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11566020

Barabas, K.; Milner, R.; Lurie, D. und Adin, C. (2008): Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications, *Vet Comp Oncol* (Band 6), Nr. 1, Seite 1-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19178659

Bett, A. J.; Haddara, W.; Prevec, L. und Graham, F. L. (1994): An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 19, Seite 8802-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8090727

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 7), Nr. 6, Seite 1513-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=388356

Boldin, M. P.; Varfolomeev, E. E.; Pancer, Z.; Mett, I. L.; Camonis, J. H. und Wallach, D. (1995): A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 14, Seite 7795-8.

Brattain, M. G.; Fine, W. D.; Khaled, F. M.; Thompson, J. und Brattain, D. E. (1981): Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma, *Cancer Res* (Band 41), Nr. 5, Seite 1751-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7214343
file://localhost/Nina/Promotion/ninas.doc

Bredesen, D. E.; Rao, R. V. und Mehlen, P. (2006): Cell death in the nervous system, *Nature* (Band 443), Nr. 7113, Seite 796-802. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17051206

Budd, R. C.; Yeh, W. C. und Tschopp, J. (2006): cFLIP regulation of lymphocyte activation and development, *Nat Rev Immunol* (Band 6), Nr. 3, Seite 196-204. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16498450

Cartron, P. F.; Juin, P.; Oliver, L.; Martin, S.; Meflah, K. und Vallette, F. M. (2003): Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis, *Mol Cell Biol* (Band 23), Nr. 13, Seite 4701-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12808108

Castedo, M.; Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Andreau, K.; Medema, R. und Kroemer, G. (2004): Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition, *Oncogene* (Band 23), Nr. 16, Seite 2825-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15077146

Certo, M.; Del Gaizo Moore, V.; Nishino, M.; Wei, G.; Korsmeyer, S.; Armstrong, S. A. und Letai, A. (2006): Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members, *Cancer Cell* (Band 9), Nr. 5, Seite 351-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16697956

Chanan-Khan, A. (2005): Bcl-2 antisense therapy in B-cell malignancies, *Blood Rev* (Band 19), Nr. 4, Seite 213-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15784299

Chandra, D.; Choy, G.; Daniel, P. T. und Tang, D. G. (2005): Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2, *J Biol Chem* (Band 280), Nr. 19, Seite 19051-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15757910

Chartier, C.; Degryse, E.; Gantzer, M.; Dieterle, A.; Pavirani, A. und Mehtali, M. (1996): Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*, *J Virol* (Band 70), Nr. 7, Seite 4805-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8676512>

Chen, L.; Willis, S. N.; Wei, A.; Smith, B. J.; Fletcher, J. I.; Hinds, M. G.; Colman, P. M.; Day, C. L.; Adams, J. M. und Huang, D. C. (2005): Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function, *Mol Cell* (Band 17), Nr. 3, Seite 393-403. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15694340

Cheng, E. H.; Sheiko, T. V.; Fisher, J. K.; Craigen, W. J. und Korsmeyer, S. J. (2003): VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis, *Science* (Band 301), Nr. 5632, Seite 513-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12881569

Cheng, E. H.; Wei, M. C.; Weiler, S.; Flavell, R. A.; Mak, T. W.; Lindsten, T. und Korsmeyer, S. J. (2001): BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis, *Mol Cell* (Band 8), Nr. 3, Seite 705-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11583631

Chu, G.; Hayakawa, H. und Berg, P. (1987): Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 15), Nr. 3, Seite 1311-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3029703

Cipolat, S.; Martins de Brito, O.; Dal Zilio, B. und Scorrano, L. (2004): OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 45, Seite 15927-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15509649

Clarke, P. G. und Clarke, S. (1996): Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena, *Anat Embryol (Berl)* (Band 193), Nr. 2, Seite 81-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8742050

Collins, S. J.; Gallo, R. C. und Gallagher, R. E. (1977): Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature* (Band 270), Nr. 5635, Seite 347-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=271272

Cory, S.; Huang, D. C. und Adams, J. M. (2003): The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis, *Oncogene* (Band 22), Nr. 53, Seite 8590-607. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14634621

Cowburn, A. S.; Cadwallader, K. A.; Reed, B. J.; Farahi, N. und Chilvers, E. R. (2002): Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival, *Blood* (Band 100), Nr. 7, Seite 2607-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12239175

Crompton, M. (2000): Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis, *Curr Opin Cell Biol* (Band 12), Nr. 4, Seite 414-9.

Czabotar, P. E.; Lee, E. F.; van Delft, M. F.; Day, C. L.; Smith, B. J.; Huang, D. C.; Fairlie, W. D.; Hinds, M. G. und Colman, P. M. (2007): Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 15, Seite 6217-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17389404

Danial, N. N. und Korsmeyer, S. J. (2004): Cell death: critical control points, *Cell* (Band 116), Nr. 2, Seite 205-19. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744432

Daniel, P. T.; Schulze-Osthoff, K.; Belka, C. und Guner, D. (2003): Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins, Essays Biochem (Band 39), Seite 73-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585075

Daniel, P.T. (2000): Dissecting the pathways to death, Leukemia (Band 14), Seite 2035-44.

Daniel, Peter T. (2008): Molekulare Grundlagen der Apoptose, Ruckpaul, Detlev Ganten und Klaus, Grundlagen der Molekularen Medizin, 3. Auflage, Seite 159-203, Springer, Berlin Heidelberg.

Degterev, A.; Lugovskoy, A.; Cardone, M.; Mulley, B.; Wagner, G.; Mitchison, T. und Yuan, J. (2001): Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL, Nat Cell Biol (Band 3), Nr. 2, Seite 173-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11175750

Delivani, P. und Martin, S. J. (2006): Mitochondrial membrane remodeling in apoptosis: an inside story, Cell Death Differ (Band 13), Nr. 12, Seite 2007-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17039250

Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L. und Wang, X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition, Cell (Band 102), Nr. 1, Seite 33-42.

Dutta, J.; Fan, Y.; Gupta, N.; Fan, G. und Gelinas, C. (2006): Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB, Oncogene (Band 25), Nr. 51, Seite 6800-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17072329

Egle, A.; Harris, A. W.; Bouillet, P. und Cory, S. (2004): Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 101), Nr. 16, Seite 6164-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15079075

Eischen, C. M.; Roussel, M. F.; Korsmeyer, S. J. und Cleveland, J. L. (2001): Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis, Mol Cell Biol (Band 21), Nr. 22, Seite 7653-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11604501

Eischen, C. M.; Weber, J. D.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J. und Cleveland, J. L. (1999): Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis, Genes Dev (Band 13), Nr. 20, Seite 2658-69. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10541552

Ekert, P. G.; Silke, J.; Hawkins, C. J.; Verhagen, A. M. und Vaux, D. L. (2001): DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9, *J Cell Biol* (Band 152), Nr. 3, Seite 483-90.

Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* (Band 391), Nr. 6662, Seite 43-50. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9422506

Fanidi, A.; Harrington, E. A. und Evan, G. I. (1992): Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes, *Nature* (Band 359), Nr. 6395, Seite 554-6. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406976

Fecker, L. F.; Geilen, C. C.; Tchernev, G.; Trefzer, U.; Assaf, C.; Kurbanov, B. M.; Schwarz, C.; Daniel, P. T. und Eberle, J. (2006): Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis, *J Invest Dermatol* (Band 126), Nr. 6, Seite 1366-71. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1652836

4

Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 84), Nr. 21, Seite 7413-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2823261

Fernandez, Y.; Verhaegen, M.; Miller, T. P.; Rush, J. L.; Steiner, P.; Opipari, A. W., Jr.; Lowe, S. W. und Soengas, M. S. (2005): Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications, *Cancer Res* (Band 65), Nr. 14, Seite 6294-304. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1602463

1

Fischer, U.; Stroh, C. und Schulze-Osthoff, K. (2006): Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10, *Oncogene* (Band 25), Nr. 1, Seite 152-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1618680

8

Fletcher, J. I. und Huang, D. C. (2006): BH3-only proteins: orchestrating cell death, *Cell Death Differ* (Band 13), Nr. 8, Seite 1268-71. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1676361

3

Frank, S.; Gaume, B.; Bergmann-Leitner, E. S.; Leitner, W. W.; Robert, E. G.; Catez, F.; Smith, C. L. und Youle, R. J. (2001): The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis, *Dev Cell* (Band 1), Nr. 4, Seite 515-25. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1170394

2

Frezza, C.; Cipolat, S.; Martins de Brito, O.; Micaroni, M.; Beznoussenko, G. V.; Rudka, T.; Bartoli, D.; Polishuck, R. S.; Danial, N. N.; De Strooper, B. und Scorrano, L. (2006): OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion, *Cell* (Band 126), Nr. 1, Seite 177-89. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16839885

Fulda, S.; Meyer, E.; Friesen, C.; Susin, S. A.; Kroemer, G. und Debatin, K. M. (2001): Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis, *Oncogene* (Band 20), Nr. 9, Seite 1063-75. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11314043

Galluzzi, L.; Vicencio, J. M.; Kepp, O.; Tasdemir, E.; Maiuri, M. C. und Kroemer, G. (2008): To die or not to die: that is the autophagic question, *Curr Mol Med* (Band 8), Nr. 2, Seite 78-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18336289

Gao, G. und Dou, Q. P. (2000): N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death, *J Cell Biochem* (Band 80), Nr. 1, Seite 53-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11029754

Germain, M.; Mathai, J. P.; McBride, H. M. und Shore, G. C. (2005): Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis, *Embo J* (Band 24), Nr. 8, Seite 1546-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15791210

Gillissen, B.; Essmann, F.; Graupner, V.; Stärck, L.; Radetzki, S.; Dörken, B.; Schulze-Osthoff, K und Daniel, P.T. (2003): Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway, *EMBOJ* (Band 22), Seite 3580-3590.

Gillissen, B.; Essmann, F.; Hemmati, P. G.; Richter, A.; Richter, A.; Oztup, I.; Chinnadurai, G.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2007): Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis, *J Cell Biol* (Band 179), Nr. 4, Seite 701-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18025305

Gossen, M. und Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 12, Seite 5547-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1319065

Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. und Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol* (Band 36), Nr. 1, Seite 59-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=886304

Graham, F. L. und van der Eb, A. J. (1973): Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5, *Virology* (Band 54), Nr. 2, Seite 536-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4737663

- Gu, J.; Kagawa, S.; Takakura, M.; Kyo, S.; Inoue, M.; Roth, J. A. und Fang, B. (2000): Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 19, Seite 5359-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11034071
- Hallaert, D. Y.; Spijker, R.; Jak, M.; Derks, I. A.; Alves, N. L.; Wensveen, F. M.; de Boer, J. P.; de Jong, D.; Green, S. R.; van Oers, M. H. und Eldering, E. (2007): Crosstalk among Bcl-2 family members in B-CLL: seliciclib acts via the Mcl-1/Noxa axis and gradual exhaustion of Bcl-2 protection, *Cell Death Differ* (Band 14), Nr. 11, Seite 1958-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17703234
- Hamada, N.; Kataoka, K.; Sora, S.; Hara, T.; Omura-Minamisawa, M.; Funayama, T.; Sakashita, T.; Nakano, T. und Kobayashi, Y. (2008): The small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 sensitizes cervical cancer cells, but not normal fibroblasts, to heavy-ion radiation, *Radiother Oncol* (Band 89), Nr. 2, Seite 227-230. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18774194
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, *Cell* (Band 100), Nr. 1, Seite 57-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10647931
- Hao, J. H.; Yu, M.; Liu, F. T.; Newland, A. C. und Jia, L. (2004): Bcl-2 inhibitors sensitize tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by uncoupling of mitochondrial respiration in human leukemic CEM cells, *Cancer Res* (Band 64), Nr. 10, Seite 3607-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15150119
- Harding, H. P.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Novoa, I.; Lu, P. D.; Calfon, M.; Sadri, N.; Yun, C.; Popko, B.; Paules, R.; Stojdl, D. F.; Bell, J. C.; Hettmann, T.; Leiden, J. M. und Ron, D. (2003): An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol Cell* (Band 11), Nr. 3, Seite 619-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12667446
- Hassan, M.; Alaoui, A.; Feyen, O.; Mirmohammadsadegh, A.; Essmann, F.; Tannapfel, A.; Gulbins, E.; Schulze-Osthoff, K. und Hengge, U. R. (2008): The BH3-only member Noxa causes apoptosis in melanoma cells by multiple pathways, *Oncogene* (Band 27), Nr. 33, Seite 4557-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18408751
- Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J. und Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR, *Genome Res* (Band 6), Nr. 10, Seite 986-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8908518
- Heikaus, S.; van den Berg, L.; Kempf, T.; Mahotka, C.; Gabbert, H. E. und Ramp, U. (2008): HA14-1 is able to reconstitute the impaired mitochondrial pathway of apoptosis in renal cell carcinoma cell lines, *Cell Oncol* (Band

- 30), Nr. 5, Seite 419-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18791273
- Hengartner, M. O. (1999): Programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Recent Prog Horm Res* (Band 54), Seite 213-22; discussion 222-4.
- Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 770-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11048727
- Hetschko, H.; Voss, V.; Senft, C.; Seifert, V.; Prehn, J. H. und Kogel, D. (2008): BH3 mimetics reactivate autophagic cell death in anoxia-resistant malignant glioma cells, *Neoplasia* (Band 10), Nr. 8, Seite 873-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18670645
- Hickman, J. A. (2002): Apoptosis and tumorigenesis, *Curr Opin Genet Dev* (Band 12), Nr. 1, Seite 67-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11790557
- Hijikata, M.; Kato, N.; Sato, T.; Kagami, Y. und Shimotohno, K. (1990): Molecular cloning and characterization of a cDNA for a novel phorbol-12-myristate-13-acetate-responsive gene that is highly expressed in an adult T-cell leukemia cell line, *J Virol* (Band 64), Nr. 10, Seite 4632-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2398525
- Hoeijmakers, J. H. (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature* (Band 411), Nr. 6835, Seite 366-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11357144
- Holinger, E. P.; Chittenden, T. und Lutz, R. J. (1999): Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 19, Seite 13298-304. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10224090
- Hossini, A. M.; Geilen, C. C.; Fecker, L. F.; Daniel, P. T. und Eberle, J. (2006): A novel Bcl-x splice product, Bcl-xAK, triggers apoptosis in human melanoma cells without BH3 domain, *Oncogene* (Band 25), Nr. 15, Seite 2160-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16288206
- Hsu, S. Y.; Kaipia, A.; McGee, E.; Lomeli, M. und Hsueh, A. J. (1997): Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 23, Seite 12401-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9356461

Hsu, Y. T. und Youle, R. J. (1997): Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 21, Seite 13829-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9153240

Hsu, Y. T. und Youle, R. J. (1998): Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 17, Seite 10777-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9553144

Jordan, M. A. und Kamath, K. (2007): How do microtubule-targeted drugs work? An overview, *Curr Cancer Drug Targets* (Band 7), Nr. 8, Seite 730-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18220533

Juin, P.; Geneste, O.; Raimbaud, E. und Hickman, J. A. (2004): Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer, *Biochim Biophys Acta* (Band 1644), Nr. 2-3, Seite 251-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14996507

Juin, P.; Hunt, A.; Littlewood, T.; Griffiths, B.; Swigart, L. B.; Korsmeyer, S. und Evan, G. (2002): c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis, *Mol Cell Biol* (Band 22), Nr. 17, Seite 6158-69. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12167710

Kapoor, S. (2008): Altered expression of the PMAIP1 gene: A major player in the evolution of gastrointestinal and systemic malignancies, *Dig Dis Sci* (Band 53), Nr. 10, Seite 2834-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18320308

Karbowski, M.; Lee, Y. J.; Gaume, B.; Jeong, S. Y.; Frank, S.; Nechushtan, A.; Santel, A.; Fuller, M.; Smith, C. L. und Youle, R. J. (2002): Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis, *J Cell Biol* (Band 159), Nr. 6, Seite 931-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12499352

Karbowski, M.; Norris, K. L.; Cleland, M. M.; Jeong, S. Y. und Youle, R. J. (2006): Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis, *Nature* (Band 443), Nr. 7112, Seite 658-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17035996

Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (Band 26), Nr. 4, Seite 239-57.

Kim, H.; Rafiuddin-Shah, M.; Tu, H. C.; Jeffers, J. R.; Zambetti, G. P.; Hsieh, J. J. und Cheng, E. H. (2006): Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies, *Nat Cell Biol* (Band 8), Nr. 12, Seite 1348-58. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17115033

Kim, R.; Emi, M.; Matsuura, K. und Tanabe, K. (2007): Antisense and nonantisense effects of antisense Bcl-2 on multiple roles of Bcl-2 as a chemosensitizer in cancer therapy, *Cancer Gene Ther* (Band 14), Nr. 1, Seite 1-11. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17041564

Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K.; Murakami, S.; Uchida, Y. und Arihiro, K. (2006): Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death, *J Pathol* (Band 208), Nr. 3, Seite 319-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16261658

Kischkel, F. C.; Hellbardt, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, *Embo J* (Band 14), Nr. 22, Seite 5579-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=85218154

Kitada, S.; Leone, M.; Sareth, S.; Zhai, D.; Reed, J. C. und Pellecchia, M. (2003): Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins, *J Med Chem* (Band 46), Nr. 20, Seite 4259-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13678404

Klionsky, D. J.; Abeliovich, H.; Agostinis, P.; Agrawal, D. K.; Aliev, G.; Askew, D. S.; Baba, M.; Baehrecke, E. H.; Bahr, B. A.; Ballabio, A.; Bamber, B. A.; Bassham, D. C.; Bergamini, E.; Bi, X.; Biard-Piechaczyk, M.; Blum, J. S.; Bredesen, D. E.; Brodsky, J. L.; Brumell, J. H.; Brunk, U. T.; Bursch, W.; Camougrand, N.; Cebollero, E.; Cecconi, F.; Chen, Y.; Chin, L. S.; Choi, A.; Chu, C. T.; Chung, J.; Clarke, P. G.; Clark, R. S.; Clarke, S. G.; Clave, C.; Cleveland, J. L.; Codogno, P.; Colombo, M. I.; Coto-Montes, A.; Cregg, J. M.; Cuervo, A. M.; Debnath, J.; Demarchi, F.; Dennis, P. B.; Dennis, P. A.; Deretic, V.; Devenish, R. J.; Di Sano, F.; Dice, J. F.; Difiglia, M.; Dinesh-Kumar, S.; Distelhorst, C. W.; Djavaheri-Mergny, M.; Dorsey, F. C.; Droge, W.; Dron, M.; Dunn, W. A., Jr.; Duszenko, M.; Eissa, N. T.; Elazar, Z.; Esclatine, A.; Eskelinen, E. L.; Fesus, L.; Finley, K. D.; Fuentes, J. M.; Fueyo, J.; Fujisaki, K.; Galliot, B.; Gao, F. B.; Gewirtz, D. A.; Gibson, S. B.; Gohla, A.; Goldberg, A. L.; Gonzalez, R.; Gonzalez-Estevez, C.; Gorski, S.; Gottlieb, R. A.; Haussinger, D.; He, Y. W.; Heidenreich, K.; Hill, J. A.; Hoyer-Hansen, M.; Hu, X.; Huang, W. P.; Iwasaki, A.; Jaattela, M.; Jackson, W. T.; Jiang, X.; Jin, S.; Johansen, T.; Jung, J. U.; Kadowaki, M.; Kang, C.; Kelekar, A.; Kessel, D. H.; Kiel, J. A.; Kim, H. P.; Kimchi, A.; Kinsella, T. J.; Kiselyov, K.; Kitamoto, K.; Knecht, E.; Komatsu, M.; Kominami, E.; Kondo, S.; Kovacs, A. L.; Kroemer, G.; Kuan, C. Y.; Kumar, R.; Kundu, M.; Landry, J.; Laporte, M.; Le, W.; Lei, H. Y.; Lenardo, M. J.; Levine, B.; Lieberman, A.; Lim, K. L.; Lin, F. C.; Liou, W.; Liu, L. F.; Lopez-Berestein, G.; Lopez-Otin, C.; Lu, B.; Macleod, K. F.; Malorni, W.; Martinet, W.; Matsuoka, K.; Mautner, J.; Meijer, A. J.; Melendez, A.; Michels, P.; Miotto, G.; Mistiaen, W. P.; Mizushima, N.; Mograbi, B.; Monastyrska, I.; Moore, M. N.; Moreira, P. I.; Moriyasu, Y.; Motyl, T.; Munz, C.; Murphy, L. O.; Naqvi, N. I.; Neufeld, T. P.; Nishino, I.; Nixon, R. A.; Noda, T.; Nurnberg, B.; Ogawa, M.; Oleinick, N. L.; Olsen, L. J.; Ozpolat, B.; Paglin, S.; Palmer, G. E.; Papassideri, I.; Parkes, M.; Perlmutter, D. H.; Perry, G.; Piacentini, M.; Pinkas-Kramarski, R.; Prescott, M.; Proikas-Cezanne, T.; Raben, N.; Rami, A.; Reggiori, F.; Rohrer, B.; Rubinsztein, D. C.; Ryan, K. M.; Sadoshima, J.; Sakagami, H.; Sakai, Y.; Sandri, M.; Sasakawa, C.; Sass, M.;

Schneider, C.; Seglen, P. O.; Seleverstov, O.; Settleman, J.; Shacka, J. J.; Shapiro, I. M.; Sibirny, A.; Silva-Zacarin, E. C.; Simon, H. U.; Simone, C.; Simonsen, A.; Smith, M. A.; Spanel-Borowski, K.; Srinivas, V.; Steeves, M.; Stenmark, H.; Stromhaug, P. E.; Subauste, C. S.; Sugimoto, S.; Sulzer, D.; Suzuki, T.; Swanson, M. S.; Tabas, I.; Takeshita, F.; Talbot, N. J.; Tallozy, Z.; Tanaka, K.; Tanaka, K.; Tanida, I.; Taylor, G. S.; Taylor, J. P.; Terman, A.; Tettamanti, G.; Thompson, C. B.; Thumm, M.; Tolkovsky, A. M.; Tooze, S. A.; Truant, R.; Tumanovska, L. V.; Uchiyama, Y.; Ueno, T.; Uzcategui, N. L.; van der Klei, I.; Vaquero, E. C.; Vellai, T.; Vogel, M. W.; Wang, H. G.; Webster, P.; Wiley, J. W.; Xi, Z.; Xiao, G.; Yahalom, J.; Yang, J. M.; Yap, G.; Yin, X. M.; Yoshimori, T.; Yu, L.; Yue, Z.; Yuzaki, M.; Zabinnyk, O.; Zheng, X.; Zhu, X. und Deter, R. L. (2008): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes, *Autophagy* (Band 4), Nr. 2, Seite 151-75. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18188003

Klopfer, A.; Hasenjager, A.; Belka, C.; Schulze-Osthoff, K.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2004): Adenine deoxynucleotides fludarabine and cladribine induce apoptosis in a CD95/Fas receptor, FADD and caspase-8-independent manner by activation of the mitochondrial cell death pathway, *Oncogene* (Band 23), Nr. 58, Seite 9408-18. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15516989

Knippers, Rolf (2001): *Molekulare Genetik*, 8. Auflage, Thieme, Stuttgart, ISBN: 3134770083.

Korsmeyer, S. J.; Shutter, J. R.; Veis, D. J.; Merry, D. E. und Oltvai, Z. N. (1993): Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death, *Semin Cancer Biol* (Band 4), Nr. 6, Seite 327-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8142617

Krammer, P. H. (2000): CD95's deadly mission in the immune system, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 789-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11048730>

Krammer, P. H.; Behrmann, I.; Daniel, P.; Dhein, J. und Debatin, K. M. (1994): Regulation of apoptosis in the immune system, *Curr Opin Immunol* (Band 6), Nr. 2, Seite 279-89.

Kuribara, R.; Honda, H.; Matsui, H.; Shinjyo, T.; Inukai, T.; Sugita, K.; Nakazawa, S.; Hirai, H.; Ozawa, K. und Inaba, T. (2004): Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors, *Mol Cell Biol* (Band 24), Nr. 14, Seite 6172-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15226421

Kuwana, T.; Bouchier-Hayes, L.; Chipuk, J. E.; Bonzon, C.; Sullivan, B. A.; Green, D. R. und Newmeyer, D. D. (2005): BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol Cell* (Band 17), Nr. 4, Seite 525-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15721256

le Coutre, P.; Mologni, L.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Buchdunger, E.; Giardini, R.; Formelli, F. und Gambacorti-Passerini, C. (1999): In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase

inhibitor, J Natl Cancer Inst (Band 91), Nr. 2, Seite 163-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9923858

Leber, B.; Lin, J. und Andrews, D. W. (2007): Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes, Apoptosis (Band 12), Nr. 5, Seite 897-911. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1745315
9

Lee, E. F.; Czabotar, P. E.; van Delft, M. F.; Michalak, E. M.; Boyle, M. J.; Willis, S. N.; Puthalakath, H.; Bouillet, P.; Colman, P. M.; Huang, D. C. und Fairlie, W. D. (2008): A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation, J Cell Biol (Band 180), Nr. 2, Seite 341-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1820910
2

Lee, R.; Chen, J.; Matthews, C. P.; McDougall, J. K. und Neiman, P. E. (2001): Characterization of NR13-related human cell death regulator, Boo/Diva, in normal and cancer tissues, Biochim Biophys Acta (Band 1520), Nr. 3, Seite 187-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1156635
4

Lei, X.; Chen, Y.; Du, G.; Yu, W.; Wang, X.; Qu, H.; Xia, B.; He, H.; Mao, J.; Zong, W.; Liao, X.; Mehrpour, M.; Hao, X. und Chen, Q. (2006): Gossypol induces Bax/Bak-independent activation of apoptosis and cytochrome c release via a conformational change in Bcl-2, Faseb J (Band 20), Nr. 12, Seite 2147-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1693593
7

Letai, A.; Bassik, M. C.; Walensky, L. D.; Sorcinelli, M. D.; Weiler, S. und Korsmeyer, S. J. (2002): Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics, Cancer Cell (Band 2), Nr. 3, Seite 183-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1224215
1

Li, J. und Yuan, J. (2008): Caspases in apoptosis and beyond, Oncogene (Band 27), Nr. 48, Seite 6194-206. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1893168
7

Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S. und Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, Cell (Band 91), Nr. 4, Seite 479-89. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9390557

Li, Y.; Tennekoon, G. I.; Birnbaum, M.; Marchionni, M. A. und Rutkowski, J. L. (2001): Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival, Mol Cell Neurosci (Band 17), Nr. 4, Seite 761-7. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11312610

Lindsten, T.; Ross, A. J.; King, A.; Zong, W. X.; Rathmell, J. C.; Shiels, H. A.; Ulrich, E.; Waymire, K. G.; Mahar, P.; Frauwirth, K.; Chen, Y.; Wei, M.; Eng, V. M.; Adelman, D. M.; Simon, M. C.; Ma, A.; Golden, J. A.; Evan, G.; Korsmeyer, S. J.; MacGregor, G. R. und Thompson, C. B. (2000): The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues, *Mol Cell* (Band 6), Nr. 6, Seite 1389-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11163212

Loeb, L. A.; Loeb, K. R. und Anderson, J. P. (2003): Multiple mutations and cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 3, Seite 776-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12552134

Macoska, J. A.; Adsule, S.; Tantivejkul, K.; Wang, S.; Pienta, K. J. und Lee, C. T. (2008): -(-)Gossypol promotes the apoptosis of bladder cancer cells in vitro, *Pharmacol Res* (Band 58), Nr. 5-6, Seite 323-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18840529

Maniatis, T (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Meeusen, S.; DeVay, R.; Block, J.; Cassidy-Stone, A.; Wayson, S.; McCaffery, J. M. und Nunnari, J. (2006): Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1, *Cell* (Band 127), Nr. 2, Seite 383-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17055438

Mei, Y.; Xie, C.; Xie, W.; Tian, X.; Li, M. und Wu, M. (2007): Noxa/Mcl-1 balance regulates susceptibility of cells to camptothecin-induced apoptosis, *Neoplasia* (Band 9), Nr. 10, Seite 871-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17971907

Mickey, D. D.; Stone, K. R.; Wunderli, H.; Mickey, G. H. und Paulson, D. F. (1980): Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice, *Prog Clin Biol Res* (Band 37), Seite 67-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7384095

Morales, A. A.; Gutman, D.; Lee, K. P. und Boise, L. H. (2008): BH3-only proteins Noxa, Bmf, and Bim are necessary for arsenic trioxide-induced cell death in myeloma, *Blood* (Band 111), Nr. 10, Seite 5152-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18354037

Naik, E.; Michalak, E. M.; Villunger, A.; Adams, J. M. und Strasser, A. (2007): Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa, *J Cell Biol* (Band 176), Nr. 4, Seite 415-24. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17283183

Nefedova, Y.; Sullivan, D. M.; Bolick, S. C.; Dalton, W. S. und Gabrilovich, D. I. (2008): Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy, *Blood* (Band 111), Nr. 4, Seite 2220-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18039953

Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y. und Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields, *Embo J* (Band 1), Nr. 7, Seite 841-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6329708

Nicholson, D. W. (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death, *Cell Death Differ* (Band 6), Nr. 11, Seite 1028-42.

Nunez, G.; Benedict, M. A.; Hu, Y. und Inohara, N. (1998): Caspases: the proteases of the apoptotic pathway, *Oncogene* (Band 17), Nr. 25, Seite 3237-45.

Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T. und Tanaka, N. (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* (Band 288), Nr. 5468, Seite 1053-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10807576

Oh, K. J.; Barbuto, S.; Pitter, K.; Morash, J.; Walensky, L. D. und Korsmeyer, S. J. (2006): A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 48, Seite 36999-7008. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16987815

Okada, H. und Mak, T. W. (2004): Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells, *Nat Rev Cancer* (Band 4), Nr. 8, Seite 592-603. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15286739

Oltersdorf, T.; Elmore, S. W.; Shoemaker, A. R.; Armstrong, R. C.; Augeri, D. J.; Belli, B. A.; Bruncko, M.; Deckwerth, T. L.; Dinges, J.; Hajduk, P. J.; Joseph, M. K.; Kitada, S.; Korsmeyer, S. J.; Kunzer, A. R.; Letai, A.; Li, C.; Mitten, M. J.; Nettesheim, D. G.; Ng, S.; Nimmer, P. M.; O'Connor, J. M.; Oleksijew, A.; Petros, A. M.; Reed, J. C.; Shen, W.; Tahir, S. K.; Thompson, C. B.; Tomaselli, K. J.; Wang, B.; Wendt, M. D.; Zhang, H.; Fesik, S. W. und Rosenberg, S. H. (2005): An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature* (Band 435), Nr. 7042, Seite 677-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15902208

Opferman, J. T.; Letai, A.; Beard, C.; Sorcinelli, M. D.; Ong, C. C. und Korsmeyer, S. J. (2003): Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1, *Nature* (Band 426), Nr. 6967, Seite 671-6. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14668867

Osford, S. M.; Dallman, C. L.; Johnson, P. W.; Ganesan, A. und Packham, G. (2004): Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells, *Curr Med Chem* (Band 11), Nr. 8, Seite 1031-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15083809

Pelengaris, S.; Khan, M. und Evan, G. I. (2002): Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression, *Cell* (Band 109), Nr. 3, Seite 321-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12015982

Pellegrini, L. und Scorrano, L. (2007): A cut short to death: Parl and Opa1 in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis, *Cell Death Differ* (Band 14), Nr. 7, Seite 1275-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17464328

Perez-Galan, P.; Roue, G.; Villamor, N.; Montserrat, E.; Campo, E. und Colomer, D. (2006): The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status, *Blood* (Band 107), Nr. 1, Seite 257-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16166592

Perkins, C.; Kim, C. N.; Fang, G. und Bhalla, K. N. (1998): Overexpression of Apaf-1 promotes apoptosis of untreated and paclitaxel- or etoposide-treated HL-60 cells, *Cancer Res* (Band 58), Nr. 20, Seite 4561-6.

Petros, A. M.; Medek, A.; Nettesheim, D. G.; Kim, D. H.; Yoon, H. S.; Swift, K.; Matayoshi, E. D.; Oltersdorf, T. und Fesik, S. W. (2001): Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 6, Seite 3012-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11248023

Pinton, P.; Giorgi, C.; Siviero, R.; Zecchini, E. und Rizzuto, R. (2008): Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis, *Oncogene* (Band 27), Nr. 50, Seite 6407-18. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18955969

Qin, J. Z.; Xin, H.; Sitailo, L. A.; Denning, M. F. und Nickoloff, B. J. (2006): Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA, *Cancer Res* (Band 66), Nr. 19, Seite 9636-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17018621

Qin, J. Z.; Ziffra, J.; Stennett, L.; Bodner, B.; Bonish, B. K.; Chaturvedi, V.; Bennett, F.; Pollock, P. M.; Trent, J. M.; Hendrix, M. J.; Rizzo, P.; Miele, L. und Nickoloff, B. J. (2005): Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells, *Cancer Res* (Band 65), Nr. 14, Seite 6282-93. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16024630

Rampino, N.; Yamamoto, H.; Ionov, Y.; Li, Y.; Sawai, H.; Reed, J. C. und Perucho, M. (1997): Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science* (Band 275), Nr. 5302, Seite 967-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9020077

Rathmell, J. C.; Lindsten, T.; Zong, W. X.; Cinalli, R. M. und Thompson, C. B. (2002): Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis, *Nat Immunol* (Band 3), Nr. 10, Seite 932-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12244308

Raven, J. F. und Koromilas, A. E. (2008): PERK and PKR: old kinases learn new tricks, *Cell Cycle* (Band 7), Nr. 9, Seite 1146-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18418049

Ray, S.; Bucur, O. und Almasan, A. (2005): Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor, *Apoptosis* (Band 10), Nr. 6, Seite 1411-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16215673

Reed, J. C. (1998): Bcl-2 family proteins, *Oncogene* (Band 17), Nr. 25, Seite 3225-36.

Renan, M. J. (1993): How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data, *Mol Carcinog* (Band 7), Nr. 3, Seite 139-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8489711

Rizzatti, E. G.; Mora-Jensen, H.; Weniger, M. A.; Gibellini, F.; Lee, E.; Daibata, M.; Lai, R. und Wiestner, A. (2008): Noxa mediates bortezomib induced apoptosis in both sensitive and intrinsically resistant mantle cell lymphoma cells and this effect is independent of constitutive activity of the AKT and NF-kappaB pathways, *Leuk Lymphoma* (Band 49), Nr. 4, Seite 798-808. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18398749

Roccaro, A. M.; Vacca, A. und Ribatti, D. (2006): Bortezomib in the treatment of cancer, *Recent Patents Anticancer Drug Discov* (Band 1), Nr. 3, Seite 397-403. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18221049

Rudin, C. M.; Kozloff, M.; Hoffman, P. C.; Edelman, M. J.; Karnauskas, R.; Tomek, R.; Szeto, L. und Vokes, E. E. (2004): Phase I study of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, combined with carboplatin and etoposide in patients with small-cell lung cancer, *J Clin Oncol* (Band 22), Nr. 6, Seite 1110-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15020613

- Sattler, M.; Liang, H.; Nettesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B. und Fesik, S. W. (1997): Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis, *Science* (Band 275), Nr. 5302, Seite 983-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9020082
- Scaffidi, C.; Fulda, S.; Srinivasan, A.; Friesen, C.; Li, F.; Tomaselli, K. J.; Debatin, K. M.; Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1998): Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *Embo J* (Band 17), Nr. 6, Seite 1675-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9501089
- Scherer, W. F.; Syverton, J. T. und Gey, G. O. (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *J Exp Med* (Band 97), Nr. 5, Seite 695-710. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1305282
- 8
- Schuler, M. und Green, D. R. (2001): Mechanisms of p53-dependent apoptosis, *Biochem Soc Trans* (Band 29), Nr. Pt 6, Seite 684-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1170905
- 4
- Scorrano, L.; Ashiya, M.; Buttle, K.; Weiler, S.; Oakes, S. A.; Mannella, C. A. und Korsmeyer, S. J. (2002): A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis, *Dev Cell* (Band 2), Nr. 1, Seite 55-67. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1178231
- 4
- Seo, Y. W.; Shin, J. N.; Ko, K. H.; Cha, J. H.; Park, J. Y.; Lee, B. R.; Yun, C. W.; Kim, Y. M.; Seol, D. W.; Kim, D. W.; Yin, X. M. und Kim, T. H. (2003): The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 48, Seite 48292-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1450071
- 1
- Shen, J. und Prywes, R. (2004): Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 41, Seite 43046-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1529901
- 6
- Shi, Y. (2004): Caspase activation: revisiting the induced proximity model, *Cell* (Band 117), Nr. 7, Seite 855-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1521010
- 7
- Smit, L. A.; Hallaert, D. Y.; Spijker, R.; de Goeij, B.; Jaspers, A.; Kater, A. P.; van Oers, M. H.; van Noesel, C. J. und Eldering, E. (2007): Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity, *Blood* (Band 109), Nr. 4, Seite 1660-8. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17038534

Strasser, A.; Harris, A. W.; Bath, M. L. und Cory, S. (1990): Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2, *Nature* (Band 348), Nr. 6299, Seite 331-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2250704

Stuhmer, T.; Chatterjee, M.; Hildebrandt, M.; Herrmann, P.; Gollasch, H.; Gerecke, C.; Theurich, S.; Cigliano, L.; Manz, R. A.; Daniel, P. T.; Bommert, K.; Vassilev, L. T. und Bargou, R. C. (2005): Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma, *Blood* (Band 106), Nr. 10, Seite 3609-17. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16081689

Sturm, I.; Kohne, C. H.; Wolff, G.; Petrowsky, H.; Hillebrand, T.; Hauptmann, S.; Lorenz, M.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (1999): Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases, *J Clin Oncol* (Band 17), Nr. 5, Seite 1364-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10334520

Sturm, I.; Petrowsky, H.; Volz, R.; Lorenz, M.; Radetzki, S.; Hillebrand, T.; Wolff, G.; Hauptmann, S.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2001): Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis, *J Clin Oncol* (Band 19), Nr. 8, Seite 2272-81. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11304781

Sturm, I.; Stephan, C.; Gillissen, B.; Siebert, R.; Janz, M.; Radetzki, S.; Jung, K.; Loening, S.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2006): Loss of the tissue-specific proapoptotic BH3-only protein Nbk/Bik is a unifying feature of renal cell carcinoma, *Cell Death Differ* (Band 13), Nr. 4, Seite 619-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16322756

Subramanian, T. und Chinnadurai, G. (2003): Pro-apoptotic activity of transiently expressed BCL-2 occurs independent of BAX and BAK, *J Cell Biochem* (Band 89), Nr. 6, Seite 1102-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12898509

Sugiyama, T.; Shimizu, S.; Matsuoka, Y.; Yoneda, Y. und Tsujimoto, Y. (2002): Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by apro-apoptotic BH3-only protein Bim, *Oncogene* (Band 21), Nr. 32, Seite 4944-56. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12118373

Sundstrom, C. und Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937), *Int J Cancer* (Band 17), Nr. 5, Seite 565-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=178611

Suzuki, S.; Nakasato, M.; Shibue, T.; Koshima, I. und Taniguchi, T. (2009): Therapeutic potential of proapoptotic molecule Noxa in the selective elimination of tumor cells, *Cancer Sci* (Band 100), Nr. 4, Seite 759-69. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19298224

Szegezdi, E.; Logue, S. E.; Gorman, A. M. und Samali, A. (2006): Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *EMBO Rep* (Band 7), Nr. 9, Seite 880-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16953201

Tan, T. T.; Degenhardt, K.; Nelson, D. A.; Beaudoin, B.; Nieves-Neira, W.; Bouillet, P.; Villunger, A.; Adams, J. M. und White, E. (2005): Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy, *Cancer Cell* (Band 7), Nr. 3, Seite 227-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15766661

Trudel, S.; Li, Z. H.; Rauw, J.; Tiedemann, R. E.; Wen, X. Y. und Stewart, A. K. (2007): Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma, *Blood* (Band 109), Nr. 12, Seite 5430-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17332241

Tse, C.; Shoemaker, A. R.; Adickes, J.; Anderson, M. G.; Chen, J.; Jin, S.; Johnson, E. F.; Marsh, K. C.; Mitten, M. J.; Nimmer, P.; Roberts, L.; Tahir, S. K.; Xiao, Y.; Yang, X.; Zhang, H.; Fesik, S.; Rosenberg, S. H. und Elmore, S. W. (2008): ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor, *Cancer Res* (Band 68), Nr. 9, Seite 3421-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18451170

Tsujimoto, Y. und Croce, C. M. (1986): Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 83), Nr. 14, Seite 5214-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3523487

Tsujimoto, Y.; Finger, L. R.; Yunis, J.; Nowell, P. C. und Croce, C. M. (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation, *Science* (Band 226), Nr. 4678, Seite 1097-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6093263

Tsujimoto, Y. und Shimizu, S. (2007): Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death, *Apoptosis* (Band 12), Nr. 5, Seite 835-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17136322

van Delft, M. F.; Wei, A. H.; Mason, K. D.; Vandenberg, C. J.; Chen, L.; Czabotar, P. E.; Willis, S. N.; Scott, C. L.; Day, C. L.; Cory, S.; Adams, J. M.; Roberts, A. W. und Huang, D. C. (2006): The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized, *Cancer*

Cell (Band 10), Nr. 5, Seite 389-99. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17097561

Vassilev, L. T.; Vu, B. T.; Graves, B.; Carvajal, D.; Podlaski, F.; Filipovic, Z.; Kong, N.; Kammlott, U.; Lukacs, C.; Klein, C.; Fotouhi, N. und Liu, E. A. (2004): In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, Science (Band 303), Nr. 5659, Seite 844-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14704432

Vaux, D. L.; Cory, S. und Adams, J. M. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, Nature (Band 335), Nr. 6189, Seite 440-2. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3262202

Verhagen, A. M.; Ekert, P. G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L. M.; Reid, G. E.; Moritz, R. L.; Simpson, R. J. und Vaux, D. L. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins, Cell (Band 102), Nr. 1, Seite 43-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929712

Villunger, A.; Michalak, E. M.; Coultas, L.; Mullauer, F.; Bock, G.; Ausserlechner, M. J.; Adams, J. M. und Strasser, A. (2003): p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa, Science (Band 302), Nr. 5647, Seite 1036-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14500851

von Haefen, C.; Gillissen, B.; Hemmati, P. G.; Wendt, J.; Guner, D.; Mrozek, A.; Belka, C.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2004): Multidomain Bcl-2 homolog Bax but not Bak mediates synergistic induction of apoptosis by TRAIL and 5-FU through the mitochondrial apoptosis pathway, Oncogene (Band 23), Nr. 50, Seite 8320-32. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15467752

von Haefen, C.; Wieder, T.; Gillissen, B.; Starck, L.; Graupner, V.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2002): Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells, Oncogene (Band 21), Nr. 25, Seite 4009-19. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12037683

Vucic, D. und Fairbrother, W. J. (2007): The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer, Clin Cancer Res (Band 13), Nr. 20, Seite 5995-6000. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17947460

Walensky, L. D.; Pitter, K.; Morash, J.; Oh, K. J.; Barbuto, S.; Fisher, J.; Smith, E.; Verdine, G. L. und Korsmeyer, S. J. (2006): A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX, Mol Cell (Band 24), Nr. 2, Seite 199-210. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17052454

Wang, J. L.; Liu, D.; Zhang, Z. J.; Shan, S.; Han, X.; Srinivasula, S. M.; Croce, C. M.; Alnemri, E. S. und Huang, Z. (2000): Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 13, Seite 7124-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10860979

Wang, K.; Yin, X. M.; Chao, D. T.; Millman, C. L. und Korsmeyer, S. J. (1996): BID: a novel BH3 domain-only death agonist, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 22, Seite 2859-69.

Wang, Z. und Sun, Y. (2008): Identification and characterization of two splicing variants of human Noxa, *Anticancer Res* (Band 28), Nr. 3A, Seite 1667-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18630524

Warr, M. R. und Shore, G. C. (2008): Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer, *Curr Mol Med* (Band 8), Nr. 2, Seite 138-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18336294

Wendt, J.; von Haefen, C.; Hemmati, P.; Belka, C.; Dorken, B. und Daniel, P. T. (2005): TRAIL sensitizes for ionizing irradiation-induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway, *Oncogene* (Band 24), Nr. 25, Seite 4052-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15806163

Wieder, T.; Essmann, F.; Prokop, A.; Schmelz, K.; Schulze-Osthoff, K.; Beyaert, R.; Dörken, B. und Daniel, P. T. (2001): Activation of Caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor ligand interaction and occurs downstream of Caspase-3, *Blood* (Band 97), Seite 1378-87.

Willis, S. N. und Adams, J. M. (2005): Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis, *Curr Opin Cell Biol* (Band 17), Nr. 6, Seite 617-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16243507

Willis, S. N.; Chen, L.; Dewson, G.; Wei, A.; Naik, E.; Fletcher, J. I.; Adams, J. M. und Huang, D. C. (2005): Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins, *Genes Dev* (Band 19), Nr. 11, Seite 1294-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15901672

Willis, S. N.; Fletcher, J. I.; Kaufmann, T.; van Delft, M. F.; Chen, L.; Czabotar, P. E.; Ierino, H.; Lee, E. F.; Fairlie, W. D.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Kluck, R. M.; Adams, J. M. und Huang, D. C. (2007): Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak, *Science* (Band 315), Nr. 5813, Seite 856-9. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1728999
9

Woerner, S. M.; Kloor, M.; Mueller, A.; Rueschoff, J.; Friedrichs, N.; Buettner, R.; Buzello, M.; Kienle, P.; Knaebel, H. P.; Kunstmann, E.; Pagenstecher, C.; Schackert, H. K.; Moslein, G.; Vogelsang, H.; von Knebel Doeberitz, M. und Gebert, J. F. (2005): Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas, *Oncogene* (Band 24), Nr. 15, Seite 2525-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1573573
3

Wong, W. W. und Puthalakath, H. (2008): Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway, *IUBMB Life* (Band 60), Nr. 6, Seite 390-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1842579
3

Wyllie, A. H.; Bellamy, C. O.; Bubb, V. J.; Clarke, A. R.; Corbet, S.; Curtis, L.; Harrison, D. J.; Hooper, M. L.; Toft, N.; Webb, S. und Bird, C. C. (1999): Apoptosis and carcinogenesis, *Br J Cancer* (Band 80), Nr. Suppl 1, Seite 34-7.

Youle, R. J. und Karbowski, M. (2005): Mitochondrial fission in apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 6), Nr. 8, Seite 657-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1602509
9

Youle, R. J. und Strasser, A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 9), Nr. 1, Seite 47-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1809744
5

Yu, J.; Wang, Z.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. und Zhang, L. (2003): PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 100), Nr. 4, Seite 1931-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1257449
9

Zaher, M.; Akrou, I.; Mirshahi, M.; Kolb, J. P. und Billard, C. (2008): Noxa upregulation is associated with apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells induced by hyperforin but not flavopiridol, *Leukemia*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1878474
2

Zhai, D.; Jin, C.; Huang, Z.; Satterthwait, A. C. und Reed, J. C. (2008): Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1, *J Biol Chem* (Band 283), Nr. 15, Seite 9580-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1817856
5

Zhang, L.; Yu, J.; Park, B. H.; Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (2000): Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents, *Science* (Band 290), Nr. 5493, Seite 989-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1106213
2

Zhang, Y.; Adachi, M.; Kawamura, R. und Imai, K. (2006): Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis, *Cell Death Differ* (Band 13), Nr. 1, Seite 129-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1594778

9

Zimmermann, K. C.; Bonzon, C. und Green, D. R. (2001): The machinery of programmed cell death, *Pharmacol Ther* (Band 92), Nr. 1, Seite 57-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1175003

6

Zong, W. X.; Lindsten, T.; Ross, A. J.; MacGregor, G. R. und Thompson, C. B. (2001): BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 12, Seite 1481-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1141052

8

Anhang

Sequenzen von Noxa_S, Noxa_L und Noxa_{L2}

Nachfolgend ist die Sequenz des humanen Chromosoms 18 von Base 55718172 bis 55722518 (NCBI Referenzsequenz: NC_000018.8) dargestellt. Farbig markiert sind die Exons 1, 2 und 3 von *noxa* und die verschiedenen Spleißvarianten *noxa_S*, *noxa_L* sowie *noxa_{L2}*.

Protein Noxa_L: Exon 1+2+3; ORF

MPGKKARKNA QPSPARAPAG PAGTAGTARD QAGFAIGMQL RFTRGKKLL_S SSLSSSPLAL
PRGHEEQVQV AGSRVCYSTQ EIWRQTELPA ETSESDIOTL LLRNLTASKT CMRGLLQKSF
LRRCTFHQFE ERLHCN

Protein Noxa_{L2}: Exon1+2+3; ORF

MPGKKARKNA QPSPARAPAG PAGTAGTARD QAGFAIGMQL RFTRGKKLL_S SSLSSSPLAL
PRGHEEQVQL EVECATQLRR FGDKLNFRQK LLNLISKLF_C SGT

Protein Noxa_S: Exon 1+3; ORF

MPGKKARKNA QPSPARAPAE LEVECATQLR RFGDKLNFRQ KLLNLISKLF CSQT

BH3-Domäne:

CTCAGGAGATTGGAGACAAACTGAAC

NCBI Referenzsequenz: NC_000018.8:

```
0001 ACTGGACAAA AGCGTGGTCT CTGGCGCGGG GATCTCAGAG TTTCCCGGGC ACTCACCGTG 0060
0061 TGTAGTTGGC ATCTCCGCGC GTCCGGACAC CCGATCCCAG CATCCCTGCC TGCAGGACTG 0120
0121 TTCGTGTTCA GCTCGCGTCC TGCAGCTGTC CGAGGTGCTC CAGTTGGAGG CTGAGGTTCC 0180
0181 CGGGCTCTGT AGCTGAGTGG GCGGCGGCAC CGGCGGAGAT GCCTGGGAAG AAGGCGCGCA 0240
0241 AGAACGCTCA ACCGAGCCCC GCGCGGGCTC CAGCAGGTAC CGACCCGCTG GGGCCAGCGA 0300
0301 AGACCCAGGC CGGGCGGGGT CGGGGCCGGG GTCGAGGTCT CGGCTGGGGC GGGCTCAGCT 0360
0361 CGCCGGGGCT CAAGCACAGA CTGCACGGGG GTCAAGGTCG GGCCAGGTCT GTGCCCTGGC 0420
0421 GCGAGCCTTA GGGGCGCCTC CAGAAAGTTC TTCGGGGTTT TTCCCAGGA CCGGCGGGTA 0480
0481 CGGCGGGTAC GGCGAGGGAC CAAGCCGGAT TTGCGATTGG GATGCAGCTG CGTTTCACCA 0540
0541 GGGGCAAAAA GTCCTTTTCC TCCTCTCTTT CCTCCTCGCC ACTTGCCCTT CCCCAGGGCC 0600
```

0601	ACGAGGAACA	AGTGCAAGTG	TAGGCGGCTG	TCTCTAGGAG	AAAGTCATTG	TCGCGGCAGA	0660
0661	AGGGGCAGGA	GAGAGCCCCG	GGGACCGCCT	GGACTCCCAG	CGCTTCCAGA	GACGGCCCCA	0720
0721	CAAGGGCCCC	TGTGTTTCAGG	AGCCTAGAAA	ATCTTGTAAC	ATTTAAATAA	TCGATATTGT	0780
0781	GGGAGGTGGG	GATAGGAGAA	TAGGAGTTAG	TCCGCTCCTT	TTTTTCATTC	ATTCATTTCG	0840
0841	ACTCCCCACC	CCGATACATA	CAGCTCCATC	GTAAGTTTTT	AGGCCAGCGC	CCCGGCCCCA	0900
0901	TGCTTTTTTCT	AAATCTAAAC	AGAGAACCCA	GTCAGTCCCC	AGAGCCCCGAA	GTCTGTGTGG	0960
0961	GCCATACTGC	TGTTGCATCA	GACGATTATA	CGCCCCCCCC	ACCTTTTAAAG	TTACTTTTCAT	1020
1021	TTTATAGAGC	TCCTGGGGCG	TGCGAAGGAA	GTGGTGCATT	GCAAATGTGA	CCATGCCTAA	1080
1081	GTTGGTAACA	GGCTGCTGTC	TCTGGCGCTT	GTGTGGGATG	GAAAAAGCTT	TGTCTACCTT	1140
1141	TTGTGATGTC	TTAGGATTCT	GACCTTGTTT	CTTTCTGAAG	GATCTTACTT	ATGCATAGCA	1200
1201	CTTTCTGGTC	CGACTTAATT	CCCAAGAACA	GGAAGCAGCA	CAAAGTCCCT	CTTAAACTTG	1260
1261	ATTTGATTGA	TACTAATACA	TTTATAGGTG	TGTAATGCAA	TTTTTAAAAA	ATTAAGGAAA	1320
1321	TGACCGGGAA	GTATTTTCTG	CCTTGTTTTT	TACATTTTTG	GTGAAAGGGA	TAACTTTTC	1380
1381	ACTTAGAATT	CAGGGCTTCC	AGTGTCCGAC	GCTGAATGGT	ATTTGGTTTT	TCTTTTAGAA	1440
1441	CTGTATATTA	ATATATCTCA	ATCTCTGTAG	ACAACATGTC	TATGTAAATA	CTTCCCAACA	1500
1501	TATTTGATCT	TGTAGCCCAT	AAAGAATAAC	ACCTTAAGGG	ATTTATTAGG	TCTCTTGGTG	1560
1561	TAGGAGTTAG	GAAAGATTTC	ACTCACTTCT	TGTAGAGAGA	AATTGGTTGA	AATATAGGTT	1620
1621	TAAGATTTTG	CTTTACTATA	TATTGACAGC	TTTGATTTAT	TTTGAGCCTA	AATACGGTAT	1680
1681	TTTCAGGGTC	GATTTATAAA	ATAGACCAGA	TTTTAATTTG	TAATCATGAT	TTTTTAATGT	1740
1741	TTGTAATCAT	GAAGTGTAAC	CGAAAGACCT	CAAGCTGCTC	TTTGAAATAT	TCAAGAAAAAT	1800
1801	TGAAATTATA	GTCAGTATAG	ATACGATATT	ATAGTCAGTA	TAGTGTTAAC	TGCACTTACT	1860
1861	GAAAAAAGT	GTACTTGGA	ATTATAAGCA	TCATTTTTCT	TAATATTCAG	TTAGAATAAC	1920
1921	TCAATTCCAA	AAAGTAGTAA	ACATGTGAAT	TAAACATTGC	TTATTTTCTG	CTCCTCTCAT	1980
1981	TTCCATAAAG	GCAATGGATT	GGTACATAAT	GGGGTTATAG	GAAGAAGTGG	GTTTACATTA	2040
2041	AAATAGAAAT	GTTTAAATTA	TTTTAGAGAA	TGTGGACTTA	ATTTTAGAAT	AAGATTTTAT	2100
2101	GAGTCTTTTA	TGAAAAAATA	TCAGCGTTTT	TTAACGAGAA	AAAGAATACC	TCTAGATTTG	2160
2161	CCTATATAAT	GAGAGTATAA	CCTAAGCTGT	AAATTATTGC	CATTTGAAAA	TCAAATCCTA	2220
2221	CTTGAAAGCC	ACACAGAACT	TGACTTCTGT	TTCCCAGCCA	ACCTTAAATG	AAGAGAAAAA	2280
2281	GATGACATCA	TCTAAGGCTG	GTGACTTATG	CTACTCTTTG	TAGCATTGCT	TTTAAAAATA	2340
2341	ACAAAGTGGT	TTTACAATGT	TCTCACATCC	CAAAGAATGA	TAATGCTACT	CTTTGTGGTA	2400
2401	TTTGACATAT	TTGAAAGTAA	GGTAACACTT	GCCTCATCCA	GGATGCGTTT	TTTAAAAACT	2460
2461	CAAAGTAAAT	GTCTTTATTC	TTACCTTAAC	GATTGCTTTC	GGTGAGTCAC	AATGTGTGTA	2520
2521	AGTGTGTGTG	TGTGTCACAT	TTGGAAAACA	GGTGACACATA	AAGCCAAAGT	TAAGAGAAAT	2580

2581 GCTTCCTGGG ATACTCAATT TGTCAC TAGT GTGGGCGTAT TAGGTTTTGC TGGTTACAGT 2640
 2641 CTGTAATATC ATCAATGTTT ATGTCCATGT TTTGCTTTCC TTCTCAGAGC TGGGAAGTCGA 2700
 2701 GTGTGCTACT CAACTCAGGA GATTGAGAG CAACTGAAC TTCCGGCAGA AACTTCTGAA 2760
 2761 TCTGATATCC AAATCTTCT GCTCAGGAAC CTGACTGCAT CAAAAACTTG CATGAGGGGA 2820
 2821 CTCCTTCAAA AGAGTTTTCT CAGGAGGTGC ACGTTTCATC AATTGGAAGA AAGACTGCAT 2880
 2881 TGTAAATTGAG AGGAATGTGA AGGTGCATTC ATGGGTGCCC TTGGAAACGG AAGATGGAAT 2940
 2941 ACATCAAAGT GAATTTCTGT TCAAGTTTTC CCAGATTATC ATTCTTTGGG ATGAGAGAAC 3000
 3001 ATTATAAAAC CACTTTGTTT ATTTTAAAGC AAGAATGGAA GACCCCTGAA AATAAAGAAG 3060
 3061 TAATTATTGA CACATTTCTT TTTTACTTAG AGAATCGTTC TAGTGTTTTT GCCGAAGATT 3120
 3121 ACCGCTGGCC TACTGTGAAG GGAGATGACC TGTGATTAGA CTGGGCGGCT GGGGAGAAAC 3180
 3181 AGTTCAGTGC ATTGTTGTTG TTGCTGTTTT TGGTGTTTTG CTTTTCAGTG CCAACTCAGC 3240
 3241 ACATTGTATA TGATTCGGTT TATACATATT ACCTTGTTAT AATGAAAAAA CTCATTCTGA 3300
 3301 GAACACTGAA ATGTTATACT CAGTGTTGAT TTCTTCGGTC ACTACACAAC GTAAATCAT 3360
 3361 TTGTTTCTTT TGAATCAAAT TGTATTGCTT CTGTTTCAGAT GATCTTTCAT TCAATGTGTT 3420
 3421 CCTGTTGGGC GTTACTAGAA ACTATGGAAA ACTGGAAAAT AACTTTGAAA AAATTGGATA 3480
 3481 AAGTATAGGA GGGTTACTTG GGGCCAGTAA ATCAGTAGAC TGAACATTCA ATATAATAAA 3540
 3541 AGAACATGGG GATTTTGTAT AACCAGGGAT AATAAAAAGA AAAAAGAAGT TAATTTTAA 3600
 3601 TTGATGTTTT TGAAACTTAG TAGAACAAAT ATTCAGAAGT AACTTGATAA GATATGAATG 3660
 3661 TTTCTAAAGA AGTTTCTAAA GGTTCGGAAA ATGCTCCTTG TCACATTAGT GTGCATCCTA 3720
 3721 CAAAAAGTGA TCTCTTAATG TAAATTAAGA ATATTTTCAT AATTGGAATA TACTTTTCTT 3780
 3781 AAAAAAAGG AACAGTTAGT TCTCATCTAG AATGAAAGTT CCATATATGC ATTGGTGAAT 3840
 3841 ATATATGTAT ACACATACTT ACATACTTAT ATGGGTATCT GTATAGATAA TTTGTATTAG 3900
 3901 AGTATTATAT AGCTTCTTAG TAGGGTCTCA AGTAAGTTTC ATTTTTTTTA TCTGGGCTAT 3960
 3961 ATACAGTCCT CAAATAAATA ATGTCTTGAT TTTATTTTCTAG CAGGAATAAT TTTATTTATT 4020
 4021 TTGCCTATTT ATAATTAAAG TATTTTCTT TAGTTTGAAA ATGTGTATTA AAGTTACATT 4080
 4081 TTTGAGTTAC AAGAGTCTTA TAACTACTTG AATTTTTAGT TAAAATGTCT TAATGTAGGT 4140
 4141 TGTAGTCACT TTAGATGGAA AATTACCTCA CATCTGTTTT CTTAGTATT ACTTAAGATT 4200
 4201 GTTTATTTAG TGGTAGAGAG TTTTTTTTTT CAGCCTAGAG GCAGCTATTT TACCATCTGG 4260
 4261 TATTTATGGT CTAATTTGTA TTAAACATA TGCACACATA TAAAAGTTGA TACTGTGGCA 4320
 4321 GTAACTATT AAAAGTTTTT ACTGTTC

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro (x 10 ⁻⁶)
A	Adenin
A1	Bcl-2 related protein A1
Abl	Abelson leukemia tyrosine kinase
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AIF	Apoptosis inducing factor
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-B	Bcl-2-like 10
Bcl-G	Bcl-2-like 14
Bcl-w	Bcl-2-like 2
Bcl-x	Bcl-2-like 1
BGHpolyA	bovine growth hormone polyadenylation
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bim	Bcl-2 interAktig mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3

Bok	Bcl-2-related ovarian killer
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C3	Caspase-3
C9	Caspase-9
CAD	Caspase-activated DNase
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure
CARD	Caspase activation and recruitment domain
Caspasen	cysteine aspartate-specific proteases
cDNA	komplementäre DNA
CHOP	C/EBP homologes Protein
CMV	Cytomegalovirus
CPE	cytopatischer Effekt
Da	Dalton
dATP	2'-Deoxyadenosin 5'-Triphosphat
DD	Death domain
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DED	Death-effector domain
$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
DISC	Death-induced signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Todesrezeptor
DRP1	Dynamin-related Protein 1

CsCl	Cäsiumchlorid
CVL	Crude virus lysate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
endoG	Endonuklease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas associated death domain
FCS	Fetal Calf Serum
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
G	Guanin
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
h	Stunde
Hdm-2	human double minute 2 protein
Hrk	Harakiri
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICAD	inhibitor of Caspase-activated DNase
ICE	Interleukin-1beta-converting enzyme
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria Broth Bakterienmedium
LTR	left inverted terminal repeat
m	Meter

M	molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukaemia sequence-1
MEF	mouse embryonic fibroblast
Mfn	Mitofusin
min	Minute
MOI	multiplicity of infection
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
Nbk/Bik	natural born killer/Bcl-2-interAktig killer
NF- κ B	nuclear factor κ B
Noxa	angelehnt an das griechische Wort schädlich
ORF	open reading frame
OPA1	optic atrophy 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARL	presenilin-associated rhomboid-like protease
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PERK	pancreatic endoplasmic reticulum eIF2 α kinase
pfu	Plaquebildende Einheiten (plaque forming units)
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumjodid
PI3 Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
P _{minCMV}	immediate early promoter of cytomegalovirus
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
RITR	right inverted terminal repeat

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SV40	Simianes Virus 40
T	Thymin
tBid	trunkierte Form von Bid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF-receptor associated death domain
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRE	tetracycline-responsive element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	tetracycline-controlled transactivator
U	units
u.a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VDAC	voltage dependent anion channel
W	Watt
WB	Westernblot
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Daniel bedanken, der mir das interessante Dissertationsthema zur Verfügung gestellt hat, mir die Möglichkeit gegeben hat dieses in seinem Labor zu bearbeiten, für die fachliche Unterstützung und vielen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen, für die Möglichkeit die Ergebnisse auf internationalen Konferenzen vorzustellen und nicht zuletzt für die Durchsicht der Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Bernd Dörken, in dessen Abteilung diese Arbeit angefertigt wurde.

Dr. Bernhard Gillissen möchte ich für die zahlreichen fachlichen Anmerkungen und Diskussionen sowie für die kritische Durchsicht meines Manuskripts danken.

Thomas Rathjen und Tim Overkamp danke ich ebenfalls für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Jana Wendt danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine fachlichen Probleme hatte und mir mit gutem Rat zur Seite stand.

Josefine Ruß, Cindrilla Chumduri, Sandy Adjemian und Thomas Rathjen möchte ich für die stete Unterstützung und die vielen lustigen Mittagspausen danken. Dies hat für mich entscheidend zum guten Klima im Labor beigetragen.

Antje und Anja Richter danke ich für die Einarbeitung im Labor und die Unterstützung in technischen Fragen.

Josefine Ruß und Kerstin Dietze danke ich für die technische Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Projekte.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klinische und Molekulare Onkologie in der Robert-Rössle-Klinik für die vielen Anregungen und praktischen Tipps.

Meinen Eltern Birgit Keydel und Wolfgang Gebhardt bin ich sehr dankbar für die stete Unterstützung und das Vertrauen in mich.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Daniel Kracht bedanken, der immer in mich und mein Können vertraut hat und mir oftmals durch das Aufzeigen eines anderen Blickwinkels geholfen hat, Probleme neu anzupacken.

Meinem Sohn Theo danke ich ganz besonders, vor allem auch für sein frühes Durchschlafen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Nina Gebhardt, geb. am 23.05.1981 in Berlin, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 23. Juli 2009

Poster

Jana Wendt, Bernhard F. Gillissen, **Nina Gebhardt**, Antje Richter, Anja Richter, Josefine Ruß, Peter T. Daniel (2008): Resistance of Bax deficient tumours to TRAIL can be overcome by Mcl-1 down-regulation; 16th Euroconference on Apoptosis; Bern

Vorträge

Nina Gebhardt, Bernhard F. Gillissen, Robert Preissner, Peter T. Daniel (2007); Bax/Bak independent induction of apoptosis by BH3-mimetic small molecule compounds; 18th European Students' conference; Berlin

Nina Gebhardt, Bernhard F. Gillissen, Jana Wendt, Robert Preissner, Peter T. Daniel (2008); Bax/Bak independent induction of apoptosis by BH3-mimetic small molecule compounds; 16th Euroconference on Apoptosis; Bern

Publikationen

Nina Gebhardt, Bernhard F. Gillissen, Jana Wendt, Robert Preissner, Peter T. Daniel; Bax/Bak independent induction of apoptosis by BH3-mimetic small molecule compounds (Manuscript in preparation)

Nina Gebhardt, Bernhard F. Gillissen, Jana Wendt, Peter T. Daniel; BH3-independent induction of apoptosis by a Noxa splicing variant (Manuscript in preparation)